

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par le  
Centre international d'études supérieures en  
sciences agronomiques  
Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale SIBAGHE  
Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences,  
Hydrosciences et Environnement

Et des unités de recherche UPR 26 du CIRAD (Systèmes de culture  
à base de bananiers, plantains et ananas) et  
SYSPROD du CARBAP (Systèmes de production durable)

Spécialité : Evolution, Ecologie, Ressources génétiques,  
Paléontologie (EERGP)

Présentée par Josué NGANDO ESSOH OTTO

Sélection et évolution de la résistance aux fongicides  
systémiques chez *Mycosphaerella fijiensis* agent causal  
de la maladie des raies noires des bananiers

Soutenue le 15 décembre 2014 devant le jury composé de

Dr. Marie-France CORIO-COSTET, Directrice de recherche, INRA, Bordeaux	Rapporteur
Dr. Florence CHAPELAND-LECLERC, Maître de conférences, Université Paris-Descartes	Rapporteur
Pr. Claire NEEMA, Professeur, SupAgro, Montpellier	Examineur
Pr. Anne LEGREVE, Professeur, Université Catholique de Louvain	Examineur
Dr. Jean CARLIER, Chercheur, CIRAD, Montpellier	Directeur de thèse
Dr. Luc de Lapeyre de Bellaire, Chercheur, CIRAD, Montpellier	Co-Directeur de thèse
Dr. Andreas MEHL, Bayer CropScience, Monheim	Invité

## RESUME

Dans les systèmes de production intensifs de bananes, l'adaptation chez *Mycosphaerella fijiensis* résulte d'une interaction entre les flux de gènes et la sélection par les fongicides de souches résistantes. Le rôle de la migration a déjà été déterminé dans la thèse de Rieux (2011), l'objectif de la présente étude est de comprendre le rôle de la sélection sur l'évolution de la résistance aux fongicides chez *M. fijiensis*. A cet effet les QoI (inhibiteurs unisites de la respiration mitochondriale pour la résistance qualitative) et les DMI (inhibiteurs oligosites de la biosynthèse de l'ergostérol pour la résistance quantitative) ont été appliqués en continu en absence de flux de gènes pour provoquer une augmentation de la résistance, puis une diminution a été provoquée par l'absence de fongicides après l'arrêt de traitements. Pour suivre au champ cette évolution de la résistance, une nouvelle méthode biologique de détection (méthode conidie) a été mise au point. Un coefficient de sélection  $s = 0,7546$  a été obtenu pour les QoI et on a observé une très légère variation de la fréquence allélique depuis l'interruption de traitements. Pour les DMI l'apparition de mutations et insertions a progressivement augmenté dans la population en fonction des traitements. Par ailleurs, l'introduction artificielle continue de migrants sensibles en parcelle commerciale semble avoir un effet sur la diminution de la fréquence de la mutation G143A de résistants aux QoI. Ainsi, sur quelques générations la sélection positive et la contre sélection ont montré un fort impact sur l'évolution de la résistance aux fongicides chez *M. fijiensis*. En condition réelle de production, l'étude a mis en exergue l'effet significatif de l'interaction des flux de gènes et de la contre sélection sur la diminution de la résistance aux fongicides.

**Mots clés :** sélection, flux de gènes, résistance, fongicides systémiques, *Mycosphaerella fijiensis*, banane.

## SUMMARY

In the intensive commercial banana production, adaptation of *Mycosphaerella fijiensis* results from an interaction between gene flow and selection of resistant strains by fungicides. The role of migration has already been determined in the thesis of Rieux (2011), the objective of this study is to understand the role of selection on the evolution of fungicide resistance in *M. fijiensis*. For this purpose the QoI fungicides (single-site inhibitors of mitochondrial respiration for qualitative resistance) and DMI (oligosites inhibitors of ergosterol biosynthesis for quantitative resistance) were applied continuously in the absence of gene flow to cause an increase of resistance and a decrease was caused by the absence of fungicides after withdrawing treatments. To follow the evolution of this resistance in the field, a new biological detection method (conidial method) was developed. A coefficient of selection  $s = 0.7546$  was obtained for QoI and we observed a slight variation of the allelic frequency since treatment interruption. For DMI, the appearance of mutations and insertions gradually increased in population by treatment. In addition, the artificial continuous introduction of sensitive strains inside the commercial plot seems to decrease the G143A frequency of the resistant to QoI. Thus, on several generations selection and counter-selection showed a strong impact on the evolution of fungicide resistance in *M. fijiensis*. In the real production conditions, this study highlighted the significant effect of the interaction of gene flow and counter-selection on the reduction of fungicide resistance.

**Key words:** selection, gene flow, resistance, systemic fungicide, *Mycosphaerella fijiensis*, banana plant.



## **Merci,**

J'ai halluciné sur la complémentarité qui a existé entre mes deux Directeurs au cours de cette thèse, alors qu'on devrait souvent s'attendre à des contradictions dans les corrections et les approches aussi bien théoriques qu'expérimentales. Jean, Luc merci beaucoup pour cet excellent encadrement. Luc, merci parce que tu es celui à qui je dois presque tout le chercheur que je suis devenu depuis mon recrutement en 2005 au Carbap. Je te revois encore assis dans ton fauteuil les mains croisées derrière la tête et disant "il faut faire la part des choses..." "hmm ! il faut plus de répétitions...". Les grosses grosses manip sur le terrain et même parfois un peu audacieuses, ça te connais, les gars de l'équipe du labo phyto au Carbap en ont parfois bavés. Merci également d'avoir cru en moi depuis le montage du projet ATF sur lequel a été adossée cette thèse. Ce projet a amené beaucoup de bonheur dans l'équipe au Carbap et il reste encore une référence. Je n'ai peut-être pas été le super étudiant auquel tu t'attendais, mais je pense qu'au final je fais quand même une arrivée gagnante. Plus qu'un collègue et un encadreur, je retiens également des leçons de vie, dont l'humilité, la franchise, l'esprit d'équipe qui sont à mon avis des qualités principales. Les grosses soirées de la "MAYA" sacrée avec l'équipe du labo, les matchs de foot avec Saviola, tout ça m'a marqué. Jean, "the boss" j'ai le souvenir qu'Adrien t'avais nommé "L'indiana Jones de la banane", c'est sûr que tu iras débusquer fijiensis partout là où il se trouve. Merci infiniment pour tous les recadrages que tu as apporté lors du déroulement de cette thèse, faire l'essentiel dans le temps disponible, on n'y serait certainement pas arrivé sans toi. Du super giga projet de thèse que c'était au départ, tu as été le principal artisan de son redimensionnement et de son raffinement dans un synchronisme parfait avec Luc. Vous formez à vous deux un tandem de feu. Merci également pour la patience que tu as montrée à mon égard lors de mes multiples erreurs dans les manip.

A côté de vous deux je veux remercier Virginie qui par sa manière de simplifier choses comme par magie, m'a beaucoup mis en confiance et redonné du moral pendant des moments difficiles. Tu as beaucoup contribué à mon édification sur les notions de gén des pop. Et toi alors Adrien, la thèse m'a fait rencontrer un mec exceptionnel au grand cœur. D'acolyte en thèse comme moi, tu es rapidement passé comme encadreur aussi. Tu m'as fait découvrir la biolmol et m'a mis sur les rails pour effectuer les manip et les analyses. Merci pour tout ça. Merci surtout pour tout ce qui se passait hors boulot, les p'tits coins sympas de Montpellier te connaissent bien, tu as le don de savoir organiser des petites soirées de folie entre potes avec Peko, Ben, Eve, Ricou, Marie et tous les autres. Noël en famille chez toi a été magnifique, la découverte d'Avignon (le pont, le palais des papes, impossible d'oublier ça, ...



Je tiens ensuite à remercier Bayer cropscience pour les analyses de pyroséquençage pendant cette thèse. Andreas and Klaus many thanks for your technical support. Thanks also for the pubs trip you guys organized in Dusseldorf. I was impressed by the beer flow. Thanks for Martin and Tekla for the pyrosequencing work in the lab.

Merci à d'autres chercheurs qui ont fortement contribué à ce travail de thèse, notamment les membres de mon comité de thèse notamment Jacques David merci pour votre disponibilité, les remarques pertinentes, le cadrage et l'intérêt que vous avez donné à mes travaux de thèse. Merci également à François Delmotte pour les commentaires constructifs à travers la visio conférence, j'espère vous rencontrer physiquement. Merci aussi à toi Anne-Sophie pour tes conseils sur les phénotypages des souches résistantes aux triazoles, tes protocoles de séquençage de *cyp51*, ta participation pour le séquençage. Enfin merci aux chercheurs de BGPI qui m'ont apporté leur soutiens pour des analyses et des conseils, François Bonnot, Babeth, Françoise.

Grand merci, à l'équipe 5 de l'UMR BGPI pour leur accueil chaleureux. Marie pour ton appui technique inlassable. Lucho le Parrain tu m'as carrément secondé au labo pendant les temps de misère, la collection des souches, les répiquages, les extractions, les phénotypages au microscope. Tu as été formidable merci. Merci particulier à toi Sandrine, tu es née avec une pipette dans la main, tu m'as bien coacher pour le séquençage de *cyp51*, pendant la période la plus difficile que j'ai passé au labo, je n'y serai pas arrivé sans toi. Merci à Vero, à Geneviève, Joëlle pour votre soutien. Je ne saurai terminer avec l'équipe 5 sans dire un vibrant merci à deux petits jeunes : Remy et Henri, de vrais grands frères pour moi et ça se passe de tous commentaires, merci les mecs mais je vous ai à l'œil. A côté de ces deux-là, merci également à Romain et Loïc toujours contact visuel, pas de cafouillage !!!

Merci aux producteurs de la banane Camerounaise, à la PHP (Plantation de Haut Penja), la CDC et la SPM pour la confiance, pour avoir contribué financièrement au travers du projet ATF, d'avoir mis à disposition leurs parcelles pour des expérimentations, d'avoir appuyé ce projet sur d'autres plans logistiques. Merci à l'Assobacam avoir implémenté la mise en œuvre de ce projet. Merci à la Socapalm pour avoir mis à notre disposition la parcelle de Mbonjo. Un merci particulier aux partenaires d'autres firmes phytosanitaires locale au Cameroun pour leurs contributions financières nécessaires à ma participation au congrès, pour la fourniture de fongicide : Fimex, Jaco, LDC Cameroun. Merci particulier à Syngenta qui en plus nous a fourni le Bankit pour traiter phyto5 et le Tilt pour Mbonjo, Africaware qui nous a fourni le Tega pour Maleke.

Grand merci également à mon équipe de petits lutins au Carbap, des vrais acharnés de la cerco et les héritiers directs de la technique d'observation de la maladie selon la méthode Fourré. En tant que chercheur on est tranquille lorsqu'on a des collaborateurs techniques fiables et autonomes, j'ai beaucoup de chance de travailler avec Floribert, Madeleine, Sakio, Joseph, Clément, Oscar, Robert, Henri, Levi et Adolph sans oublier le célèbre antichoc, merci pour tout le travail qui a été abattu dans les dispositifs expérimentaux. Cette thèse est aussi la vôtre. Hors cadre professionnel, ce sont des formidables personnages, les dépositaires vivants de la "MAYA" sacrée dont la structure des membres est très hiérarchisée : on a les founding fathers Sakio, Joseph et Oscar auxquels j'ajouterai ceux qui ne font plus partie de l'équipe Catherine Abadie, maitre Wamba ; les membres et assimilés Floribert, Madeleine, Clément, Robert, Henri, Levi et Adolph ; enfin les membres d'honneur Luc, Adrien et Cécile.

Merci aux chercheurs et collègues du Carbap, Dr. Alassa-Pefoura ; Dr. Moïse, Dr. Ngoh Newilah Gérard, Pr. Emmanuel Youmbi, Emmanuel Fondi, Pascal Noupadja, Dr. Justin Okolle, Franklin Mbongo Lombi, Clétus Fonbah, Dr. Sylvain Depigny, Dr. Anicet Dassou, Dr. Guy Blaise Noumbissi et Dr. Pierre Michel Loubana pour leurs soutiens et conseils. Merci également à la Direction du Carbap.

Et puis il y a les amis qui ont agrémenté cette thèse. Tout d'abord merci à l'équipe de Njombé, Apollinaire, méta, Clétus, Franklin, Gérard, Anicet, Antoine, Parfait, Figo et Gervais avec qui on a partagé des moments de joies en famille, de foot et de bières. Ensuite mon équipe choc de Douala, mon grand frère Manu, Didier, Patrick, Frank et Yves avec qui je chemine depuis la fac et partage des moments de joies en famille.

Cette thèse marque la fin de ma vie d'étudiant, merci à vous maman et papa, vous ne le pensiez peut être pas lorsque je faisais mes premiers pas à l'école, mais voilà je suis arrivé jusqu'à ce niveau de Docteur. Merci à mes frères et sœurs, Manu, Elodie, Nadine, Yvette, Solange et Christian pour tout ce chemin parcouru ensemble.

Je ne saurai terminer sans remercier la personne qui a le plus porté le poids du sacrifice de cette thèse, en l'occurrence mon épouse Clémence qui nous fait le petit Athur "atoutou". Chérie cette thèse a peut-être ralenti nos projets de famille, mais je suis aussi sûre qu'elle nous propulsera d'avantage. Cette thèse vous est entièrement dédiée tous les deux.

Merci enfin Marie-France Corio-Costet et Florence Chapeland-Leclerc d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à Claire Neema, et Anne Legreve de faire partie du jury.

A toi aussi qui pense que je t'ai oublié, merci ....



# SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	7
Contexte général.....	9
I- INTRODUCTION GENERALE .....	11
1 - Le mode d'action des fongicides.....	11
1.1- <i>Le mode d'action des fongicides multi-sites ou de contact</i> .....	11
1.2- <i>Le mode d'action des fongicides systémiques uni-sites</i> .....	12
2- Les mécanismes génétiques de la résistance .....	17
2.1- <i>Les mécanismes de la résistance pour les fongicides MBC</i> .....	17
2.2- <i>Les mécanismes de la résistance pour les fongicides QoI</i> .....	17
2.3- <i>Les mécanismes de la résistance pour les fongicides DMI</i> .....	18
3- Les fongicides oligo-site .....	19
4- Effet de la sélection sur l'évolution de la résistance aux fongicides chez les champignons pathogènes.....	26
4.1- <i>Les différentes forces évolutives impliquées dans l'évolution de la résistance</i> .....	26
4.2- <i>La sélection dans le cas de la résistance aux fongicides</i> .....	28
4.3- <i>Le coût de la résistance</i> .....	31
5- La mesure des paramètres liés à la sélection.....	35
5.1- <i>La mesure de la sélection pour la résistance qualitative</i> .....	35
5.4- <i>Mesure expérimentale de la sélection sur des traits quantitatifs</i> .....	36
6- Le pathosystème : <i>Mycosphaerella fijiensis</i> et le bananier.....	36
6.1- <i>Le bananier</i> .....	36
6.2- <i>La MRN</i> .....	39
7- Importance économique et impact de la maladie sur la production des bananes et plantains .....	44
7.1- <i>Importance économique des bananes et plantains</i> .....	44
7.2- <i>Impact de la MRN sur la production des bananes et plantains</i> .....	44
8- La lutte contre la MRN dans la filière banane export .....	46
8.1- <i>Les stratégies de lutte chimique</i> .....	46
8.2- <i>Les conséquences de la résistance aux fongicides au Cameroun (site d'étude)</i> .....	46
9- Objectifs de la thèse .....	49

II- CHAPITRE 1 : Amélioration des méthodes biologiques de mesure de la résistance aux fongicides.....	57
Présentation générale.....	57
Article 1 : A novel bioassay to monitor fungicide sensitivity in <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....	58
III- CHAPITRE 2.....	89
III.1- Estimation d'un coefficient de sélection et de contre sélection pour la résistance au fongicide QoI dans des populations de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> soumises à l'effet de la sélection au champ.....	89
III- 2 : Evolution du polymorphisme sur le gène cyp51 associé à la résistance au DMI chez <i>Mycosphaerella fijiensis</i> dans des populations traitées au champ.....	108
IV- CHAPITRE 3 : Stratégie d'élimination de souches résistantes aux fongicides chez <i>Mycosphaerella fijiensis</i> dans une parcelle traitée en fonction des apports de migrants sensibles .....	123
1- Justification de l'étude.....	123
2- Description du modèle de simulation de l'effet des différentes pratiques culturales et des flux de gènes sur l'évolution de la résistance aux fongicides .....	123
3. Expérimentation de la pratique d'apports de migrants sensibles en ZT .....	129
4- Résultats - Discussion .....	131
5- Conclusion.....	132
V- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	141

## Contexte général

En agriculture, les maladies fongiques sont responsables de près de la moitié des pathologies enregistrées chez les plantes et les pertes de production occasionnées s'élèvent à plusieurs millions de tonnes annuelles (Lepoivre, 2003). Dans des situations extrêmes, les attaques des maladies fongiques peuvent engendrer des conséquences dramatiques aboutissant à des crises alimentaires. Les crises provoquées par certaines maladies épidémiques telles que le mildiou de la pomme de terre, le mildiou de la vigne, la graphiose de l'orme font que dans certains pays, elles ont été classées dans la rubrique des calamités agricoles (Rapilly, 1991). La nécessité de maîtriser ces menaces a entraîné l'émergence de la phytopathologie comme science multidisciplinaire dans le but d'améliorer nos connaissances sur les maladies et de développer des méthodes de lutte efficace.

A côté des méthodes de lutte culturales, génétiques ou biologiques, les fongicides sont largement utilisés pour combattre les maladies fongiques (Leroux and Gardan, 2003). L'emploi des fongicides en agriculture moderne a eu l'effet bénéfique d'améliorer significativement l'efficacité du contrôle des maladies, mais il a également engendré des conséquences néfastes sur l'homme et l'environnement. Par ailleurs, l'utilisation massive des fongicides dans les agrosystèmes a entraîné l'émergence et le développement rapide de souches résistantes qui est devenu un problème majeur en protection des cultures (Brent, 1995). En agriculture, la résistance à un nouveau fongicide peut émerger en 2 ans. Cette évolution rapide est une réponse aux fortes pressions de sélection exercées par les fongicides et s'expliquerait en grande partie par le fort potentiel adaptatif (résultant de : système de reproduction mixte, grandes tailles de population, temps générationnel court, grande capacité de dispersion) connu chez les champignons pathogènes (Mc Donald and Linde, 2002). La résistance aux fongicides est un ajustement stable et héritable, aboutissant à la réduction de la sensibilité à ce fongicide dans les populations pathogènes (Scheinflug, 1987; Ma and Michailides, 2005). La résistance d'une population à un fongicide est donc une adaptation, puisqu'elle est le résultat d'un processus évolutif qui tend à différencier les populations qui s'adaptent à des conditions environnementales différentes (Lenormand, 1998; Barton *et al.*, 2007). Dans cette adaptation, la sélection est la principale force évolutive qui favorise les mutants résistants dans les populations pathogènes. La compréhension du rôle d'un tel phénomène s'avère ainsi primordiale pour faciliter la prévention et la gestion efficace de la résistance aux fongicides.

Dans le cadre de cette thèse, je me suis intéressé au rôle de la sélection dans le cas de la résistance aux fongicides chez *Mycosphaerella fijiensis* agent causal de la maladie des raies noires (MRN) des bananiers. Les bananiers cultivés sont composés de bananes à cuire et de banane

dessert. Les bananes à cuire, dont le groupe des plantains, sont cultivés de manière extensive et sont des aliments de base important et contribuent à la sécurité alimentaire dans un grand nombre de zones de productions tropicales. Une grande partie des bananes dessert sont destinées à l'exportation. Les bananes exportées appartiennent toutes au sous-groupe Cavendish, sont cultivés de manière intensive, et constituent des sources de devises importantes pour les pays exportateurs situés en zone tropicale. Les bananes exportées sont récoltés vertes, et transportés dans des conteneurs frigorifiques en bateau jusqu'aux murisseries dans les pays importateurs. Les fruits doivent être récoltés à un âge physiologique optimal pour garantir leur conservation à l'état vert jusqu'à leur destination. Un des effets majeurs de la MRN est qu'elle induit un murissement précoce des fruits les rendant impropres à l'export (Stover, 1974; Chillet and de Lapeyre de Bellaire, 1996). Cette maladie foliaire induit également des pertes de rendement (Stover and Simmonds, 1987). Dans les systèmes de production intensifs où il n'existe pas de variétés résistantes, l'exportation des fruits n'est réalisable qu'au moyen d'une lutte chimique rigoureuse (Fouré, 1988). Dans le contexte du Cameroun, l'utilisation intensive de certains fongicides a entraîné l'émergence rapide et la généralisation de la résistance chez les populations de *M. fijiensis* et une perte de contrôle la maladie. Ces résistances fongicides fluctuent au cours du temps et ce contexte a donc servi de cadre à cette thèse pour mieux comprendre le rôle de la sélection dans l'évolution spatio-temporelle des résistances aux fongicides.

# I- INTRODUCTION GENERALE

## 1 - Le mode d'action des fongicides

En dehors de la classification selon les familles chimiques, l'émergence de la résistance a conduit les scientifiques à classer les fongicides en fonction de leur mode d'action biochimique. Généralement on distingue les fongicides à mode d'action multi-sites, oligo-sites ou uni-sites (Brent *et al.*, 1998; Leroux and Gardan, 2003). Les fongicides multi-sites agissent sur plusieurs sites d'action primaires aboutissant au blocage de la respiration et de la perméabilité sélective de la membrane plasmique. Les fongicides uni-sites ou oligo-sites sont plus spécifiques et perturbent une seule voie métabolique. L'efficacité des fongicides dépend des propriétés de mobilité des molécules dans la plante. Ainsi, les fongicides multi-sites sont généralement aussi dits de contact car ils ne pénètrent pas dans les tissus de la plante. Ils n'ont alors qu'une action préventive sur la germination des spores. Les fongicides oligo-sites ou unisites ont généralement une systémie plus ou moins importante dans les tissus de la plante. Ils peuvent être soit pénétrants avec une répartition locale, soit véhiculés dans les vaisseaux du xylème ou du phloème. Ces fongicides ont donc un effet curatif et agissent après l'infection des tissus par les champignons (Leroux and Gardan, 2003).

Dans cette étude je m'intéresse aux fongicides qui sont utilisés pour la lutte contre les champignons ascomycètes aériens des maladies foliaires et plus particulièrement contre la MRN des bananiers que je présente ci-dessous.

### 1.1- Le mode d'action des fongicides multi-sites ou de contact

Les fongicides de ce groupe sont qualifiés de multi-sites parce qu'ils interagissent avec de nombreux systèmes enzymatiques (enzymes de la glycolyse, du cycle de krebs et de la chaîne respiratoire), notamment les mécanismes impliqués dans la production d'énergie, la consommation d'oxygène et le catabolisme des substances de réserve des spores (Fig. 1). Cette forte réactivité avec de nombreux constituants cellulaires les expose à de nombreux effets secondaires et est à l'origine des multiples retraits d'utilisation (Leroux and Gardan, 2003). L'action de ces fongicides se faisant par contact avec les spores, ils doivent être appliqués à forte dose (1 à 2 kg de matière active par hectare) et plus fréquemment de manière systématique, faisant d'eux des agents polluants importants. Parmi ces fongicides on distingue les dithiocarbamates (mancozèbe, manèbe), les phthalimides (captan, folpel...) et les chloronitriles (chlorothalonil) (Leroux and Gardan, 2003). Par contre le caractère multi-sites fait que le risque de résistance pour ces fongicides est faible et ils constituent de ce fait des partenaires importants dans les stratégies anti-résistance. Ces fongicides restent efficaces malgré de longues durées



d'exposition des populations fongiques à leur action (Georgopoulos and Skylakakis, 1986; Brent *et al.*, 1998). Pour la lutte contre la MRN de nombreuses formulations à base de mancozèbe et de chlorothalonil sont employées (Tableau 1) (Marin *et al.*, 2003).

### *1.2- Le mode d'action des fongicides systémiques uni-sites*

Les fongicides systémiques agissent de manière plus spécifique sur les phénomènes de biosynthèse des composants majeurs tels que les glucides, les lipides, les mélanines, les acides aminés, les acides nucléiques et les protéines (Fig. 1) (Leroux and Gardan, 2003). Ces fongicides sont qualifiés d'uni-sites parce que leur action est ciblée sur une fonction biologique spécifique du champignon. En général il y a des résistances croisées positives chez les pathogènes pour une gamme de fongicides ayant le même mode d'action. Ainsi la résistance à un seul fongicide implique automatiquement la résistance aux autres fongicides ayant le même mode d'action. Ces fongicides ont une forte persistance d'efficacité et un effet curatif plus ou moins important, ce qui permet de limiter le nombre de traitements dans le cadre de stratégies raisonnées. Ils sont employés à des doses plus faibles que les fongicides de contact, généralement de l'ordre de 100 g de matière active par hectare.

Afin de mieux comprendre les modes d'action et les mécanismes de résistance pour les fongicides systémiques uni-sites, je m'intéresse à ceux qui ont été employés pour la lutte contre les champignons ascomycètes et particulièrement les cercosporioses du bananier parmi lesquels : (1) les antimétabolites du groupe des Methyl Benzimidazole Carbamates (MBC), (2) les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols du groupe 1 (IBS1) dont les inhibiteurs de la 14  $\alpha$ -déméthylation des stérols (DMI) et (3) les inhibiteurs de la respiration mitochondriale du groupe des Quinone Outside Inhibitors (QoI) (Tableau 1).

#### *1.2.1- Le mode d'action des fongicides MBC*

Les fongicides MBC, interfèrent avec la formation des microtubules qui sont des constituants majeurs du fuseau achromatique et du cytosquelette. Cette interaction aboutit au blocage des divisions cellulaires et de l'élongation des hyphes mycéliens. L'un des composants majeurs des microtubules est la tubuline, un hétéromère composé de deux sous unités  $\alpha$  et  $\beta$ . Les MBC se fixent sur la  $\beta$ -tubuline chez les ascomycètes et les basidiomycètes et inhibent la polymérisation des microtubules (Fig. 2) (Leroux, 2003; Leroux and Gardan, 2003; Ma and Michailides, 2005). Chez les champignons la toxicité du fongicide se traduit par l'inhibition de la germination et la déformation du tube germinatif. Parmi les fongicides de ce groupe on distingue

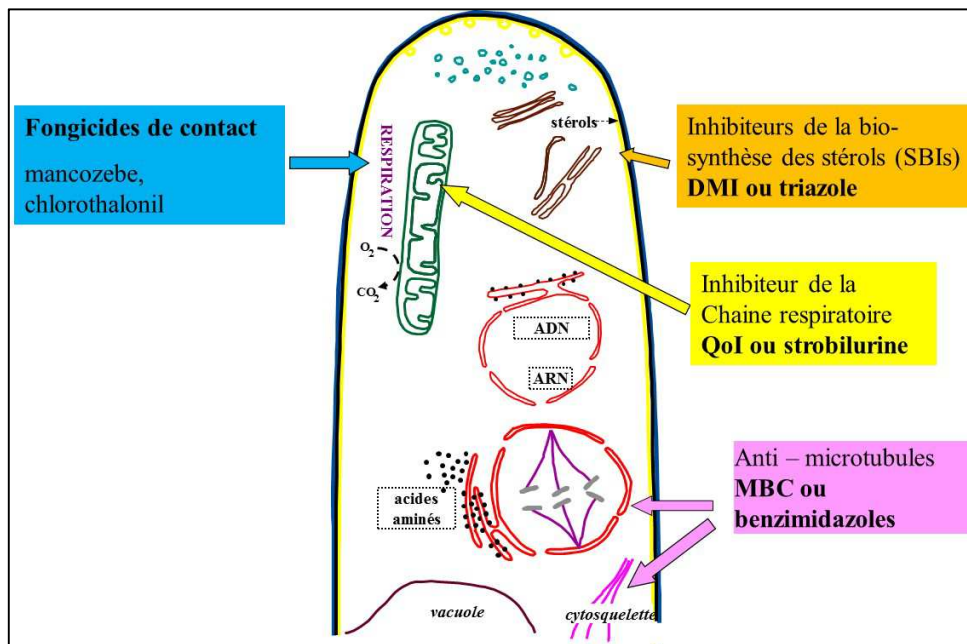
les familles des benzimidazoles (benomyl, thiabendazole) et la famille des thiophanates (thiophanate-méthyl) qui sont employés pour la lutte contre la MRN (Tableau 1).

#### *1.1.3.2- Le mode d'action des fongicides QoI*

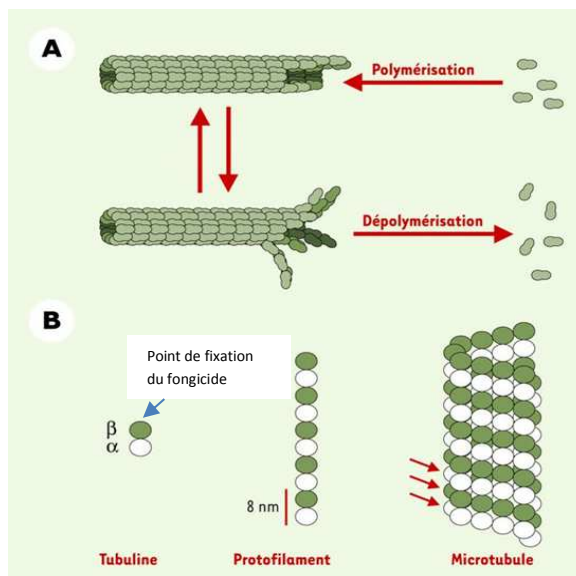
Les QoI agissent sur le complexe mitochondriale III de la membrane interne mitochondriale, ce complexe qui est formé d'une dizaine de sous unités dont le cytochrome b, le cytochrome c1 et plusieurs protéines fer-soufre assure le transfert d'électrons du coenzyme Q vers le cytochrome c (Fig. 3). Le cytochrome b possède un site d'oxydation du coenzyme Q (ubiquinone : Qo) et un site de réduction de ubiquinol (Qi) (Trumpower and Gennis, 1994). Le cytochrome b est sous la dépendance du génome mitochondrial (Leroux, 2003). En se fixant sur le Qo du cytochrome b le fongicide bloque le transfert d'électrons entre le cytochrome b et le cytochrome c1, ce qui perturbe le cycle de production d'énergie chez le champignon en stoppant la production d'ATP (Sierotzki *et al.*, 2000; Barlett *et al.*, 2002; Leroux, 2003). Chez les champignons la toxicité du fongicide se traduit par l'inhibition de la germination et de la croissance mycélienne. Ces fongicides regroupent les matières actives suivantes: azoxystrobine, trifloxystrobine, pyraclostrobine, metominostrobine, picoxystrobine et kresoxim-méthyl (Bartlett *et al.*, 2002). Les trois premières molécules sont employées pour la lutte contre la MRN (Tableau 1).

#### *1.1.3.3- Le mode d'action des fongicides DMI*

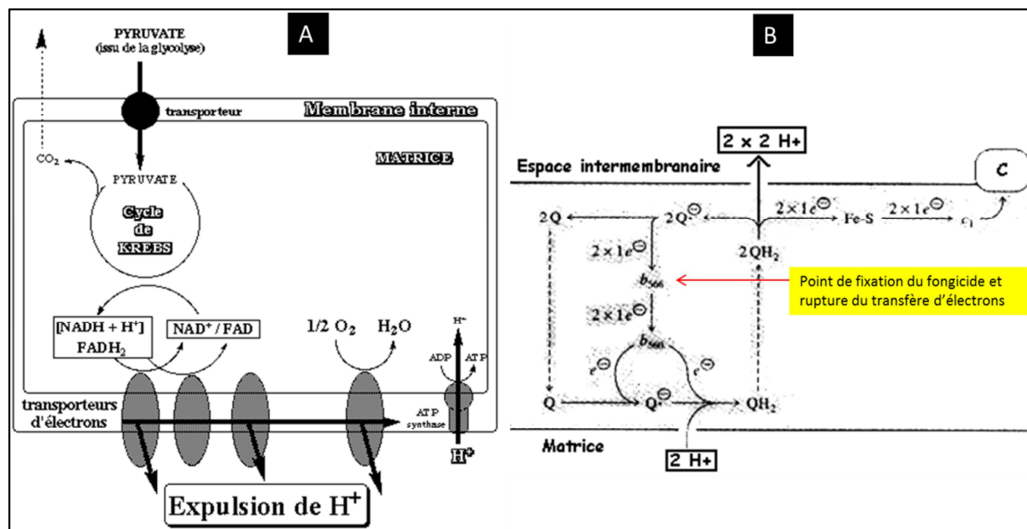
Les DMI sont des inhibiteurs de la bio-synthèse des stérols (IBS) dits du groupe 1. Plus particulièrement, l'ergostérol est un composant important de la membrane cellulaire des champignons intervenant dans la régulation de sa perméabilité (Leroux, 2003). Les DMI inhibent une enzyme la cytochrome P450 stérol C-14 $\alpha$ -deméthylase qui intervient sur la déméthylation de l'eburicol un précurseur de l'ergostérol (Fig. 4). Les DMI inhibent spécifiquement le cytochrome P450 en se liant au site actif « cysteine pocket » qui contient un hème. Ces fongicides comportent tous un atome d'azote déprotoné qui interagit avec ce site actif (Leroux and Walker, 2010). Chez les champignons la toxicité n'empêche pas la germination des spores mais entraîne une réduction de la croissance et de l'élongation des hyphes mycéliens. Plus de 30 matières actives sont actuellement connues parmi les fongicides ayant ce mode d'action. Par exemple, des fongicides appartenant à la famille des triazoles comme le propiconazole, le difenoconazole, l'époxyconazole, le triadimenol, le bitertanol, le fluzilazole, le tebuconazole le triadimefon ; mais aussi des fongicides appartenant à la famille des imidazoles comme le prochloraz, le triflumizol, et l'imazalil. Tous les triazoles cités sont employées pour la lutte contre la MRN (Tableau 1).



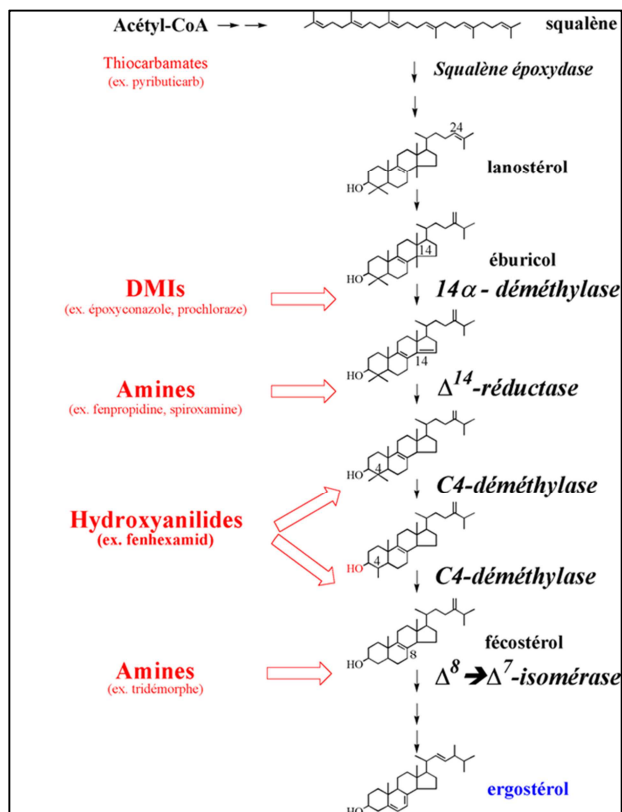
**Fig. 1.** Les sites d'action des principaux fongicides utilisés pour la lutte contre les champignons ascomycètes (*source*: Leroux & Gardan 2003)



**Fig. 2.** Le site d'action et le mode d'action des MBC. (A) la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules. (B) polymérisation des dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , association de protofilaments et élongation de microtubules (*source*: Arnal *et al.*, 2002).



**Fig. 3.** Schéma de la chaîne respiratoire indiquant le rôle de la membrane interne mitochondriale sur le transport d'électrons (A). (B) le transport d'électrons dans le complexe III de la chaîne respiratoire. (source: Horton *et al.*, 1994)



**Fig. 4.** Les sites d'action des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols IBS ou DMI (Source : Corio-Costet, *communication personnelle*)

Tableau 1 : Les principaux fongicides utilisés pour la lutte contre la maladie des raies noires (MRN) des bananiers.

Mode d'action	Site d'action	Nom de Groupe fongicide	Matière active	Nom commercial	Dose d'application
Antimitotique	$\beta$ -tubuline	MBC ( <b>M</b> ethyl, <b>B</b> enzimidazoles, <b>C</b> arbamates)	Benomyl	Benlate OD	150 - 250g/ ha
			Thiophanate-methyl	Callis 400 OL	280 – 400g / ha
Inhibiteur de la respiration	Complex III : cytochrome bc1 (ubiquinol oxidase) sur le site Qo	Fongicide QoI ( <b>Q</b> uinone <b>O</b> utside <b>I</b> nhibitor)	azoxystrobin	Bankit 25 SC	100g / ha
			pyraclostrobin trifloxystrobin	Comet plus Téga 75 EC	100g /ha 75g / ha
	complex II: succinate-dehydrogenase	SDHI ( <b>S</b> uccinate <b>d</b> ehydrogenase <b>i</b> nhibitors)	fluopyram	Verango 500 SC	100g /ha
			boscalid	Cumora 500 SC	150g /ha
Inhibiteur de la biosynthèse des stérols des membranes	C14-demethylase ( <i>Cyp51</i> )	Fongicides <b>DMI</b> ( <b>D</b> e <b>M</b> ethylation <b>I</b> nhibitors) (SBI: groupe 1) triazoles	bitertanol	Baycor 300	90g / ha
			difenoconazole	Sico 250 EC	75 – 100g /ha
			epoxiconazole	Opal 7.5 EC	75g / ha
			fluzilazole	Punch 40 EC	100g /ha
			tetraconazole	Eminent	100g /ha
			propiconazole	Tilt 250 EC	100g /ha
			tebuconazole	Folicur 250 EW	100g /ha
			triadimefon	Trical 250 EC	100g /ha
			triadimenol	Bayfidan 250 OL	100g /ha
	$\Delta^{14}$ -reductase and $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -isomerase	Amines (“Morpholines”) (SBI: groupe 2)	fenpropimorph	Volley 88 OL	440g / ha
			tridemorph	Calixine 75 EC	450g / ha
			fenpropidin	Tern	450g / ha
			spiroxamine	Impulse 800 EC	320g / ha
Inhibiteurs de synthèses d'acides aminés et de protéines	biosynthese methionine	fongicides <b>AP</b> ( <b>A</b> nilino- <b>P</b> irimidines)	pyrimethanil	Siganex 600 SC	300g/ ha
Multi-sites activité de contact	Multi-sites activité de contact	dithiocarbamates	mancozeb	Dithane 60 OS, Manzate 75 WG	1350 - 1500g /ha
		chloronitriles	chlorothalonil	Bravo 720 EC	720g /ha

EC : concentré émulsionnable; EW Emulsionnable dans l'eau; OL : liquide dispersible dans l'huile; SC : suspension concentrée; OD : poudre dispersible dans l'eau ; WG: granulés dispersible dans l'eau

## 2- Les mécanismes génétiques de la résistance

### 2.1- Les mécanismes de la résistance pour les fongicides MBC

Les fongicides MBC, notamment les benzimidazoles, ont été les premiers fongicides systémiques employés en agriculture à la fin des années 60. La résistance aux MBC survient lorsqu'il y a une perte d'affinité du fongicide avec le site de fixation de la  $\beta$ -tubuline (Fig. 2). Cette perte d'affinité est corrélée à des points de mutation sur le gène de la  $\beta$ -tubuline qui se traduisent par une modification de la séquence d'acides aminés notamment dans la zone qui correspond au site de fixation du fongicide. Plusieurs études (Ma and Michailides, 2005) ont montré que les changements sur les codons 6, 50, 134, 167, 198, 200 ou 240 du gène de la  $\beta$ -tubuline peuvent provoquer la résistance aux MBC chez les champignons (Tableau 2) (Ma and Michailides, 2005). Zou *et al.* (2006) ont montré que toutes les mutations majeures E198, Q134 et F167 sont localisées sur le même site de fixation du fongicide chez *Bauveria bassiana* (Fig. 5). Les mutations aux différents codons vont conférer différents niveaux de résistance, mais les mutations 198 et 200 confèrent en général des phénotypes de résistance très élevés chez la plupart des champignons (Koenraadt *et al.*, 1992; Albertini *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2003). Chez *M. fijiensis* les phénotypes résistants sont associés à la mutation E198A (Canas-Gutierrez *et al.*, 2006).

### 2.2- Les mécanismes de la résistance pour les fongicides QoI

Les fongicides QoI sont d'introduction plus récente (1996) et la résistance à ce groupe de fongicides est généralement apparue très rapidement, après seulement 2 à 4 ans d'utilisation (Sierotzki *et al.*, 2000). La résistance aux QoI est conférée par une mutation ponctuelle sur le gène mitochondrial du cytochrome b (*cyt b*). Plusieurs points de mutations sur le gène *cyt b* ont été identifiés conférant la résistance aux fongicides QoI (Geier *et al.*, 1992; Brasseur *et al.*, 1996). Les points de mutations affectant la sensibilité des phénotypes ont été localisés dans deux régions le gène de *cyt b* entraînant des changements d'acides aminés aux positions 127 à 147 et 275 à 296 (Geier *et al.*, 1992). Chez plusieurs champignons tels que *Plasmopara viticola*, *Erysiphe graminis f.sp tritici*, *M. fijiensis* et *Venturia. inaequalis* on retrouve dans ces deux régions les changements sur les codons 127, 129, 143, 147, 153, 255, 257, 262, 275 et 276 (Tableau 3) (Gisi *et al.*, 2000). Dans la plupart des cas la résistance est conférée par la mutation conduisant à la substitution de la glycine par l'alanine sur le codon 143 (G143A) ou de la phenylalanine par la leucine sur le codon 129 (F129L) (Bartlett *et al.*, 2002). Toutefois la mutation G143A est plus fréquente et elle confère le facteur de résistance le plus élevé (Fig. 6)(Ma and Michailides, 2005). Comme dans le cas des benzimidazoles, chez les isolats résistants les mutations sur les différents codons du gène *cyt b* confèrent différents niveaux de résistance (Ma and Michailides, 2005), mais la mutation G143A

confère généralement un niveau de résistance élevé. Chez *M. fijiensis* seule la mutation G143A a été identifiée chez les individus présentant un phénotype de résistance élevé (Gisi *et al.*, 2000; Sierotzki *et al.*, 2000). Tous les fongicides du groupe des QoI sont caractérisés par des résistances croisées. Un autre mécanisme tel que la respiration alternative est également impliqué dans l'expression de la résistance aux QoI chez les populations fongiques. Ainsi, il a été reporté chez *M. graminicola* et *Septoria tritici* que des isolats moins sensibles ne portaient pas de mutations sur le gène *cyt b* cible et que la perte de sensibilité impliquait l'activation de voies alternatives de la respiration (voie d'oxydase alternative, (AOX) (Ziogas, 1997; Sierotzki *et al.*, 2000).

### 2.3- Les mécanismes de la résistance pour les fongicides DMI

Les DMI représentent le groupe le plus employé en agriculture et en médecine depuis les années 70 et la résistance est devenue un problème sérieux à la fin de la première décennie d'utilisation (Anderson, 2005; Gisi, 2014). La même évolution a également été observée pour la lutte contre la MRN des bananiers. Chez les champignons présentant une perte de sensibilité aux DMI, trois mécanismes de résistance sont connus (Tableau 4) : (1) différentes mutations du gène *cyp51* provoquant une diminution de l'affinité du fongicide sur le site d'action ; (2) une surexpression du gène *cyp51* qui est souvent conférée par des insertions de plusieurs paires de bases dans le promoteur; (3) une augmentation de l'efflux du fongicide à la suite d'une surexpression des transporteurs membranaires ABC (ATP-binding cassette) ou MFS (major facilitator superfamily) (Anderson, 2005; Leroux *et al.*, 2007; Gisi, 2014). Le niveau de résistance mesuré est généralement différent en fonction des altérations observées sur le gène *cyp51* et des fongicides de ce groupe (Mullins *et al.*, 2011). Ainsi, la résistance est ici un trait quantitatif qui est généralement mesuré par la concentration qui inhibe 50% de la croissance du champignon (CI50) (Leroux *et al.*, 2007). Même si les altérations du gène *cyp51* sont un des mécanismes majeurs de la résistance aux DMI, la combinaison de différents mécanismes indique également une nature polygénique de la résistance aux DMI (Leroux *et al.*, 2007; Leroux and Walker, 2010).

Chez la plupart des espèces fongiques, le mécanisme le plus documenté est l'altération du gène *cyp51*. Les altérations conférant différents niveaux de résistance aux DMI sont comprises entre les codons 50 et 550 (Tableau 5). Chez les divers pathogènes on a identifié trois principales régions du génome dans lesquelles on retrouve des mutations majeures localisées à différentes positions en fonction de l'espèce fongique (Tableau 5) :

(1) Une mutation située dans la région bornée entre les codons 121 à 137 en fonction des espèces. Dans cette région la mutation aboutissant à la substitution de la tyrosine par la phénylalanine correspond à la position 121 (Y121F) chez *Aspergillus fumigatus*, 132 (Y132F) chez *Candida albicans*, 136 (Y136F) chez *E. graminis*, *Blumeria graminis tritici*, *Uncinula necator*, *M. fijiensis* et

137 (Y137F) chez *M. graminicola* (Delye *et al.*, 1998; Chau *et al.*, 2004; Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2009; Cools *et al.*, 2010; Gisi, 2014).

(2) Deux mutations situées dans une région située entre les codons 313 et 381 en fonction des espèces. La mutation aboutissant à la substitution de l'isoleucine par la valine correspondent à la position 381 (I381V) chez *M. graminicola* et chez *C. albicans* (Helmerhorst *et al.*, 1999; Cools *et al.*, 2010). La mutation aboutissant à la substitution de l'alanine par la glycine à la position 313 (A313G) chez *M. fijiensis* et 379 (A379G) chez *M. graminicola* (Leroux *et al.*, 2007; Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2009).

(3) Trois mutations situées dans une région comprise entre les codons 431 et 463 en fonction des espèces. Une première mutation aboutissant à la substitution de la tyrosine par la cytosine à la position 431 (Y431C) chez *A. fumigatus*, et des mutations équivalentes à 459 (Y459C/D/N/S) chez *M. graminicola*, et à 461 (Y461D) chez *M. fijiensis* (Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2009; Cools *et al.*, 2011). La deuxième mutation de la glycine par la serine à 448 (G448S) chez *A. fumigatus* et des mutations équivalentes G448E/R/V chez *C. albicans*. Une troisième mutation de la tyrosine par l'histidine à la position 461 (Y461H) chez *M. graminicola*, équivalente aux mutations Y463H/N/D (Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2009; Cools *et al.*, 2011) .

On constate que seulement quelques mutations sont conservées chez les divers pathogènes, mais leurs positions sur le gène diffèrent en fonction des espèces fongiques (Gisi, 2014). Chez les espèces pathogènes, plusieurs combinaisons de mutations sont également récurrentes résultant d'un déséquilibre de liaison entre les différentes mutations : exemple les mutations Y459D, Y461H/S, Y459/G460 chez *M. graminicola*, Y447-F449 chez *C. albicans*, A313, Y461-Y463 chez *M. fijiensis* (Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2009; Cools *et al.*, 2012). Les trois régions ci identifiées intégreraient le site actif "cysteine pocket" dont l'altération impacte directement la liaison avec les fongicides. Notons qu'il y a des différences sur la position des acides aminés en fonction du champignon, mais la conformation des protéines dans ces régions indique que ces positions correspondent en général aux sites de fixation des fongicides (Fig. 7) (Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2009; Mullins *et al.*, 2011).

### 3- Les fongicides oligo-site

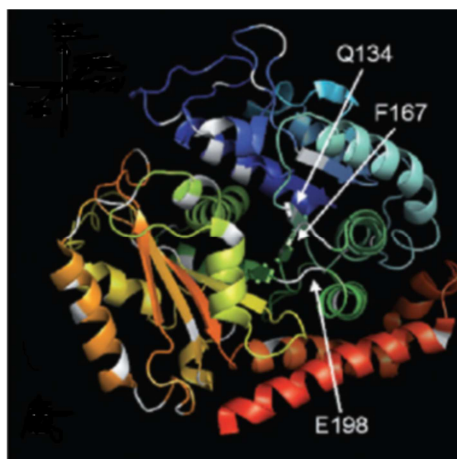
Les fongicides oligo-sites sont généralement des fongicides pénétrants ou translaminaires à faible effet curatif. Ils inhibent une voie métabolique spécifique et affectent la synthèse de composés majeurs tels que les lipides, les glucides, les protides. Les IBS du groupe 2 sont des représentants de cette catégorie de fongicides. Ces fongicides inhibent deux catégories d'enzymes (la  $\Delta^{14}$ -réductase et la  $\Delta^8 \rightarrow \Delta^7$ -isomerase) dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Fig. 4). Parmi ces fongicides on distingue les morpholines (tridemorphe, fenpropimorphe) et les



spiro-ketalamine (spiroxamine) (Leroux, 2003). Tous ces fongicides sont employés pour la lutte contre la MRN des bananiers (Tableau 1). Ces fongicides sont généralement peu affectés par l'émergence de souches résistantes.

Tableau 2 : Mutations sur le gène de la  $\beta$ -tubuline causant la résistance aux MBC chez les champignons aux MBC (source : Ma & Michailides, 2005)

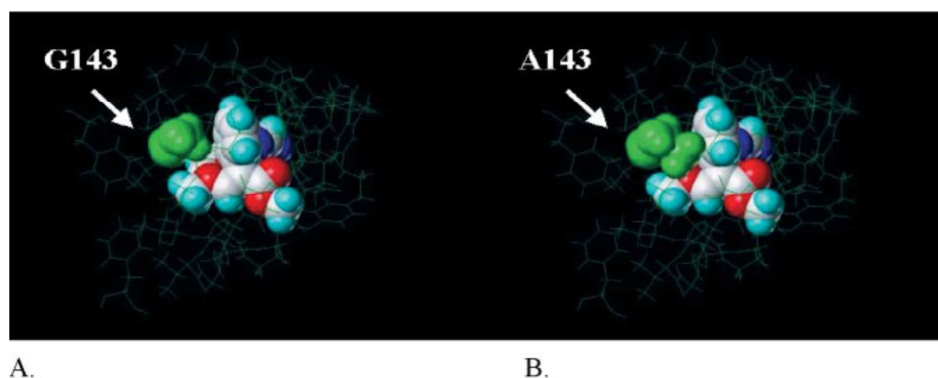
Acide aminé du gène de la $\beta$ -tubuline		Organisme	Reference
Position du codon sur le gène	Substitution		
127	Thr par Ile	<i>Magnaporthe grisea</i> <i>Mycena galopoda</i> <i>Mycena viridimarginata</i> <i>Strobilurus tenacellus</i>	Sierotzky <i>et al.</i> , 2000
129	Phe par Leu	<i>Pyricularia grisea</i>	Kim <i>et al.</i> , 2003
137	Gly par Arg		Sierotzky <i>et al.</i> , 2000
143	Gly par Ala	<i>Alternaria spp.</i> <i>Blumeria graminis f. sp. tritici</i> <i>B. graminis f. sp. hordei</i> <i>Didymella bryoniae</i> <i>Mycosphaerella fijiensis</i> <i>Pyricularia grisea</i> <i>Podosphaera fusca</i> <i>Pseudoperonospora cubensis</i> <i>Plasmopara viticola</i> <i>Sphaerotheca fuliginea</i> <i>V. inaequalis.</i>	Ma <i>et al.</i> , 2003 Sierotzki <i>et al.</i> , 2000 Baumler <i>et al.</i> , 2003 Olaya and Holm, 2001 Sierotzki <i>et al.</i> , 2000 Kim <i>et al.</i> , 2003 Ishii <i>et al.</i> , 2001 Gisi <i>et al.</i> , 2002 Zhang and Köller, 1997
	Gly par Ser	<i>Magnaporthe grisea</i>	(Avila-Adame and Köller, 2003)
147	Ile par Phe		Sierotzky <i>et al.</i> , 2000
153	Ala par Ser	<i>Mycena galopoda</i>	Sierotzky <i>et al.</i> , 2000
256	Asn par Phe ou Tyr	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gisi <i>et al.</i> , 2002
275	Leu par Ser ou Thr	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gisi <i>et al.</i> , 2002



**Fig. 5.** Analyse structurale pour la mutation d'acides amines localisées dans la sequence du gene de la  $\beta$ -tubuline chez des souches de *B. bassiana* résistantes aux MBC. Séquence mutée de la  $\beta$ -tubulin chez les résistants aux MBC, incluant les 3 mutations communes E198, Q134 et F167 souvent réportées comme étant impliquées dans la résistance chez les champignons et trouvé également chez *B. bassiana* (en blanc). Toutes les mutations sont localisées dans la moitié de la  $\beta$ -tubulin proche de la  $\alpha$ -tubulin. (Zou *et al.*, 2006)

Tableau 3 : Mutations sur le gène du cytochrome b causant la résistance chez les champignons pathogènes aux QoI (*sources* : Sierotzky *et al.* 2000 ; Ma & Michailides, 2005)

Acide aminé du gène du cytochrome b		Organismes	Références
Codon	Substitution		
127	Thr par Ile	<i>Magnaporthe grisea</i> <i>Mycena galopoda</i> <i>Mycena viridimarginata</i> <i>Strobilurus tenacellus</i>	Sierotzky <i>et al.</i> , 2000
129	Phe par Leu	<i>Pyricularia grisea</i>	Kim <i>et al.</i> , 2003
137	Gly par Arg		Sierotzky <i>et al.</i> , 2000
143	Gly par Ala	<i>Alternaria spp.</i> <i>Blumeria graminis f. sp. tritici</i> <i>B. graminis f. sp. hordei</i> <i>Didymella bryoniae</i> <i>Mycosphaerella fijiensis</i> <i>Pyricularia grisea</i> <i>Podosphaera fusca</i> <i>Pseudoperonospora cubensis</i> <i>Plasmopara viticola</i> <i>Sphaerotheca fuliginea</i> <i>V. inaequalis.</i>	Ma <i>et al.</i> , 2003 Sierotzky <i>et al.</i> , 2000 Baumler <i>et al.</i> , 2003 Olaya and Holm, 2001 Sierotzky <i>et al.</i> , 2000 Kim <i>et al.</i> , 2003 Ishii <i>et al.</i> , 2001 Gisi <i>et al.</i> , 2002 Zhang and Köller, 1997
	Gly par Ser	<i>Magnaporthe grisea</i>	(Avila-Adame and Köller, 2003)
147	Ile par Phe		Sierotzky <i>et al.</i> , 2000
153	Ala par Ser	<i>Mycena galopoda</i>	Sierotzky <i>et al.</i> , 2000
256	Asn par Phe ou Tyr	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gisi <i>et al.</i> , 2002
275	Leu par Ser ou Thr	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Gisi <i>et al.</i> , 2002



**Fig. 6.** La modélisation de la fixation du fongicide QoI sur le site Qo du complexe du cytochrome bc1. la substitution de la chaîne d'hydrogène de la glycine (A, vert) par la chaîne

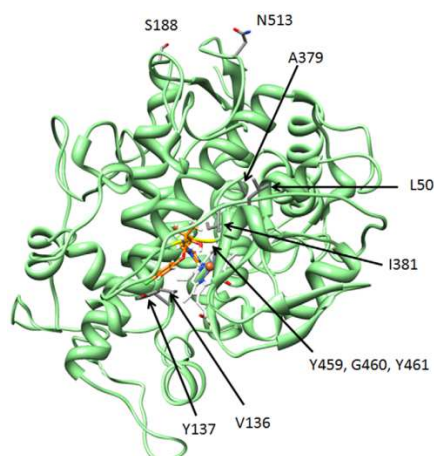
methyle de l'alanine (B, vert) influence la fixation du fongicide QoI sur son site d'action (Barlett *et al.*, 2002).

Tableau 4 : Les mécanismes de résistance aux DMI chez divers pathogènes

Pathogènes	Phénotypes*	Mécanismes de résistance			Auteurs
		Mutation sur <i>Cyp51</i>	Surexpression de <i>Cyp51</i>	Efflux	
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	MR	A313G ; Y463H ; Y463N ; Y461D ; G462A ; A381G	Insertion en tandem de 39 bp dans le promoteur		(Arango <i>et al.</i> , 2010) ; (Chong <i>et al.</i> , 2011) ; (Canas-Gutierrez <i>et al.</i> , 2009)
	R	Y136F ; Y463D ; A313G ; Y463H ; A138G	Insertion en tandem de 39-97 pb répétée 4 fois dans le promoteur		
<i>M. graminicola</i>	FR	G460D ;			(Cools <i>et al.</i> , 2012) ; (Leroux et Walker 2011) ; (Cools <i>et al.</i> , 2010) ; (Stammler <i>et al.</i> , 2008) ; (Leroux <i>et al.</i> , 2007) ;
	MR	Y137F ;			
	R	C136V ; Y460S ; V136A ; Y461H ; Y459H, Y459D ; Y459S ; I381V	Insertion de 120 pb dans le promoteur chez les résistances croisées	Efflux par ABC transporteur chez les résistances croisées	
	TR	V136A ; I381V ; A379G	Insertion de 120 pb dans le promoteur chez les résistances croisées		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Autres récentes	L50S ; S188N ; N513K ; D134G ; S524T			(Mellado <i>et al.</i> , 2004) ; (Díaz-Guerra <i>et al.</i> , 2003) ;
	R	G54E; G54V; G54R; M220V; M220K; M220T			
<i>Uncinula necator</i>	FR, MR, TR	Y136F			(Délye <i>et al.</i> , 1997)
<i>Blumeriella jaapii</i>	R		4 insertions dans le promoteur		(Ma <i>et al.</i> , 2006)
<i>Venturia inaequalis</i>	R		Insertion de 553 bp dans le promoteur		(Schnabel and Jones, 2001)
<i>Penicillium digitatum</i>	TR		Insertion en tandem de 126 bp répétées 5 fois dans le promoteur	Efflux par ABC transporteur	(Sánchez-Torres and Tuset, 2011); (Hamamoto <i>et al.</i> , 2000) ; (Nakaune <i>et al.</i> , 2002) (Yan <i>et al.</i> , 2009)
<i>Blumeria graminis tritici</i>	TR	Y136F			(Yan <i>et al.</i> , 2009)
<i>Magnaporthe grisea</i>	TS	Position mutation 240 et 450			(Fang <i>et al.</i> , 2009)
<i>Monilia fructicola</i>	R		Insertion en tandem de 65 bp répétées 5 fois dans le promoteur		(Luo and Schnabel, 2008)
<i>Cercospora beticola</i>	MR	I330T ; P384S ; E297K (mutation silencieuses)			(Bolton <i>et al.</i> , 2012); (Nikou <i>et</i>
	TR	I330T ; P384S ; E297K (mutation	Surexpression		

		silencieuses)			<i>al.</i> , 2009)
<i>Erysiphe graminis</i>	R	Y136F			(Delye <i>et al.</i> , 1998)
<i>Pyrenopeziza brassicae</i>	R		Insertion en tandem de 150 ou 232 bp répétées 4 fois dans le promoteur		(Carter <i>et al.</i> , 2014)
<i>Sclerotinia homeocarpa</i>	R		Surexpression	Efflux ABC transporteur	(Hulvey <i>et al.</i> , 2012)

\*FR: faiblement résistant; MR: moyennement résistant ; R : résistant ; TR : très résistant ; TS : très sensible



**Fig. 7.** Structure de la protéine du gène Cyp51 chez une souche sauvage de *Mycosphaerella graminicola*, montrant le site de liaison du triadimenol et la localisation des sites sujets à des altérations. Le triadimenol en orange et la région Y459/G460 en jaune, en gris les régions Y137/V136 et I381. L50 et A379 ne sont pas proches du site d'action du fongicide mais forment une partie de la structure secondaire adjacente. S188 et N513 sont localisés à la périphérie de la protéine loin du site d'action (source: Mullins *et al.*, 2011)

Tableau 5 : Récapitulatif de quelques mutations connues ayant un impact sur la sensibilité aux DMI chez divers espèces

Espèces fongiques	Positions des codons																													
	54	98	121	129	132	134	136	137	138	143	188	220	279	289	307	313	379	381	405	431	448	449	450	459	460	461	462	463	524	
<i>Erysiphe graminis</i> <sup>19</sup>							Y-F																							
<i>Blumeria graminis tritici</i> <sup>20</sup>							Y-F																							
<i>Uncinula necator</i> <sup>21</sup>							Y-F																							
<i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>16, 17, 18</sup>	G-E* G-V G-R G-W	L-H	Y-F						-C -R			M-V M-K M-T M-I M-R M-W		T-A						Y-C	G-S									
<i>Mycosphaerell a graminicola</i> <sup>10, 11, 12, 13, 14, 15</sup>						D-G	V-C V-A	Y-F			S-N						A-G	L-V							Y-C Y-D Y-N Y-S	G-D Y-S	Y-H			S-T
<i>M. fijiensis</i> <sup>7, 8, 9</sup>							Y-F		A-G								A-G										Y-D	G-A	Y-H Y-N Y-D	
<i>Candida albicans</i> <sup>1,2, 3, 4, 5, 6</sup>				G- A	Y-F Y-H					K-E K-R			S-F		G-S			L-V	S-F S-P		G-F G-R G-V	F-L F-S F-Y	G-E G-R G-V							

\*chaque lettre est un acide aminé (code IUAPC) substitué par un autre, le trait d'union entre les deux lettres étant la position du codon sur la protéine fongique. <sup>1</sup>Perea *et al.*, 2001, <sup>2</sup>Chau *et al.*, 2004, <sup>3</sup>Morio *et al.*, 2010, <sup>4</sup>Asai *et al.*, 1999, <sup>5</sup>Helmerhorst *et al.*, 1999, <sup>6</sup>Warrilow *et al.*, 2010, <sup>7</sup>Canas-Gutiérrez *et al.*, 2009, <sup>8</sup>Arango *et al.* 2010, <sup>9</sup>Chong *et al.*, 2010, <sup>10</sup>Cools & Fraaije 2012, <sup>11</sup>Cools *et al.*, 2012, <sup>12</sup>Leroux et Walker 2011, <sup>13</sup>Cools *et al.*, 2010, <sup>14</sup>Stammeler *et al.*, 2008, <sup>15</sup>Leroux *et al.*, 2007, <sup>16</sup>Mellado *et al.*, 2004 ; <sup>17</sup>Díaz-Guerra *et al.*, 2003 ; <sup>18</sup>Gisi 2013, <sup>19</sup>Délye *et al.*, 1998, <sup>20</sup>Yan *et al.*, 2009, <sup>21</sup>Délye *et al.*, 1997. En jaune la première région du gène comprise entre 121-137 comportant une (des) mutation(s) majeure(s) commune(s) à différentes espèces fongiques, en rose la 2<sup>e</sup> région (313-381), en vert la 3<sup>e</sup> région (431-463).

#### **4- Effet de la sélection sur l'évolution de la résistance aux fongicides chez les champignons pathogènes**

##### *4.1- Les différentes forces évolutives impliquées dans l'évolution de la résistance*

La structure génétique chez les champignons pathogènes est la résultante de l'interaction de cinq forces évolutives : la mutation, la recombinaison, la dérive génétique, la migration et la sélection qui affectent l'évolution de la population (Mc Donald and Linde, 2002). Sous l'effet de ces différentes forces, la croissance et la diminution de la résistance résulte d'un processus évolutif caractérisé par la compétition permanente entre les souches résistantes et les sensibles (Barton *et al.*, 2007; zur Wiesch *et al.*, 2011). En présence et en absence de fongicide la dynamique d'évolution de la résistance se déroule suivant trois grandes phases : l'émergence, la croissance et la réversion de la résistance (Fig. 8).

##### *4.1.1- L'émergence de la résistance*

L'émergence de la résistance se caractérise par la toute première apparition de mutants résistants au sein de la population. La mutation est la source fondamentale de la variation génétique qui provoque un changement dans la séquence de l'ADN d'un gène, créant alors un nouvel allèle dans la population (Mc Donald and Linde, 2002). La dynamique d'évolution de la résistance aux fongicides dépend de la présence initiale de la mutation dans la population fongique avant l'exposition au fongicide (Georgopoulos and Skylakakis, 1986; zur Wiesch *et al.*, 2011). Cette mutation peut provenir de deux sources : elle peut exister naturellement au sein de la population, parce qu'elle est générée par les mutations continues des souches sensibles ; elle peut également être apportée par la migration à partir d'une population géographiquement voisine. L'émergence de la résistance va dépendre principalement du taux de mutation ou de migration et de la taille efficace de la population selon un processus aléatoire (zur Wiesch *et al.*, 2011). Même si le taux de mutation est généralement faible ( $<10^{-5}$ ) chez les champignons pathogènes, la grande taille efficace des populations favorise leur apparition (Mc Donald and Linde, 2002; zur Wiesch *et al.*, 2011). La taille de la population affecte au travers du processus aléatoire de la dérive génétique de la diversité des gènes et peut ainsi moduler le nombre de mutants présents dans la population. Ainsi plus la taille de la population est large, moins la dérive génétique est forte et plus le nombre de mutants maintenus est important.

##### *4.1.2- Le développement de la résistance*

L'augmentation de la fréquence des individus résistants en présence du fongicide évolue généralement suivant une fonction logistique composée de trois phases : une phase d'établissement, une phase de croissance exponentielle et une phase d'équilibre.

Au cours de la phase d'établissement, l'augmentation des mutants est faible parce que la dérive génétique s'oppose à la sélection. L'établissement des mutants se déroule suivant un processus aléatoire qui dépend de l'avantage sélectif de la mutation et de la taille efficace de la population (zur Wiesch *et al.*, 2011).

Au cours de la phase de croissance exponentielle, le nombre de souches résistantes croît rapidement sous l'effet des traitements. La dynamique de cette évolution dépend directement de l'avantage sélectif des résistants en présence du fongicide.

Au cours de la phase d'équilibre la fréquence des individus résistants arrive à des niveaux élevés et croît lentement jusqu'à l'optimum. Deux évolutions peuvent se présenter : (i) Dans le premier cas la fréquence de résistants est optimale et il y a une extinction ou disparition des souches sensibles. L'extinction va alors évoluer suivant un processus aléatoire dépendant du fort avantage sélectif des résistants et de la taille de la population. Si la taille de la population est faible, les résistants seront plus abondants au cours des cycles de contaminations et les sensibles vont disparaître sous l'effet de la dérive génétique. (ii) Dans le deuxième cas, en présence du fongicide il y a une coexistence prolongée des sensibles et des résistants suivant un processus déterminé par des facteurs tels que la migration et la recombinaison. La recombinaison peut apporter dans le cas de la résistance polygénique plusieurs combinaisons et génotypes intermédiaires entre les résistants et sensibles qui deviennent majoritaires sous l'effet des traitements. Il y a une érosion graduelle de la sensibilité, ce qui permet de maintenir de manière prolongée les deux types résistants et sensibles dans la population. Par ailleurs, la migration apporte en continue des souches sensibles et s'oppose ainsi à la croissance rapide des résistants.

#### 4.1.3- La réversion de la résistance

La diminution de la résistance en absence de fongicide suit les mêmes étapes que celles de sa croissance, mais le processus est plus lent (zur Wiesch *et al.*, 2011). Les sensibles ayant disparu en présence de fongicide, doivent réapparaître par mutation reverse ou par la migration et s'installent durablement dans la population en fonction de leur avantage sélectif opposé à la dérive génétique qui tend à les faire disparaître suivant un processus aléatoire. La dynamique de la croissance des sensibles sera alors déterminée principalement par l'effet de la sélection s'il y a un coût de la résistance et de la migration. A l'équilibre l'extinction des souches résistantes et leur coexistence avec les sensibles suivent à l'inverse le même processus que lors de la croissance de la résistance.

Parmi les cinq forces mises en jeu pour la variation de la fréquence de résistants, la sélection joue un rôle majeur. Je vais particulièrement m'intéresser à la sélection dans cette étude.



#### 4.2- La sélection dans le cas de la résistance aux fongicides

La sélection est la principale force qui gouverne l'augmentation de la fréquence de l'allèle mutant (Mc Donald and Linde, 2002). Elle agit sur la préservation de variations favorables et le rejet des variations non favorables (Darwin cité par Barton *et al.*, 2007). La sélection est le processus au cours duquel des individus différents par certains caractères sont plus aptes à survivre au cours des générations. Pour la résistance aux fongicides la sélection mesure la différence de fitness relative entre les individus résistants et sensibles au cours des générations (Milgroom *et al.*, 1989; Barton *et al.*, 2007; Kingsolver and Pfennig, 2007). La fitness mesure la contribution relative de chaque génotype sur la génération suivante, c'est-à-dire la capacité de ce génotype à survivre et à se reproduire dans un environnement donné (Ennos and McConnell, 1995). Pour comprendre comment procède la sélection, il est important de déterminer si le phénotype de résistance observé résulte soit de l'action d'un gène majeur (cas de la sélection disruptive) soit de l'interaction de plusieurs gènes (cas de la sélection directionnelle) (Georgopoulos and Skylakakis, 1986).

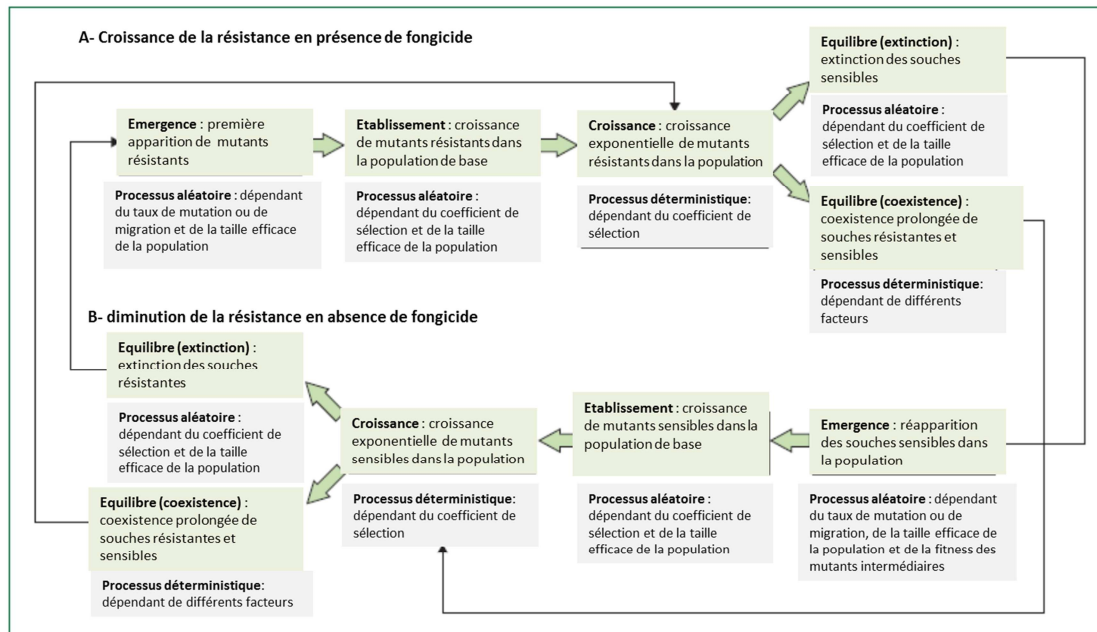
##### 4.2.1- La sélection disruptive

Dans le cas où la résistance est contrôlée par un gène majeur, la perte complète de l'efficacité du fongicide arrive généralement de manière brusque. Dans ce cas une mutation unique sur le gène codant pour la protéine cible du fongicide va entraîner des modifications structurales aboutissant à une perte d'affinité du fongicide sur le site d'action. Les individus porteurs de cette mutation ont alors une fitness très élevée dans un environnement où le fongicide est présent (Georgopoulos and Skylakakis, 1986; Scheinpflug, 1987). A l'échelle de la population les changements apparaissent qualitatifs et on observe alors une discontinuité de la fréquence de distribution des individus de la population entre les sensibles et les mutants résistants (encadré 1A). Dans ce mode de sélection disruptive c'est la fréquence de l'allèle résistant qui caractérise la population ce qui est le cas pour les fongicides à mode d'action MBC et QoI.

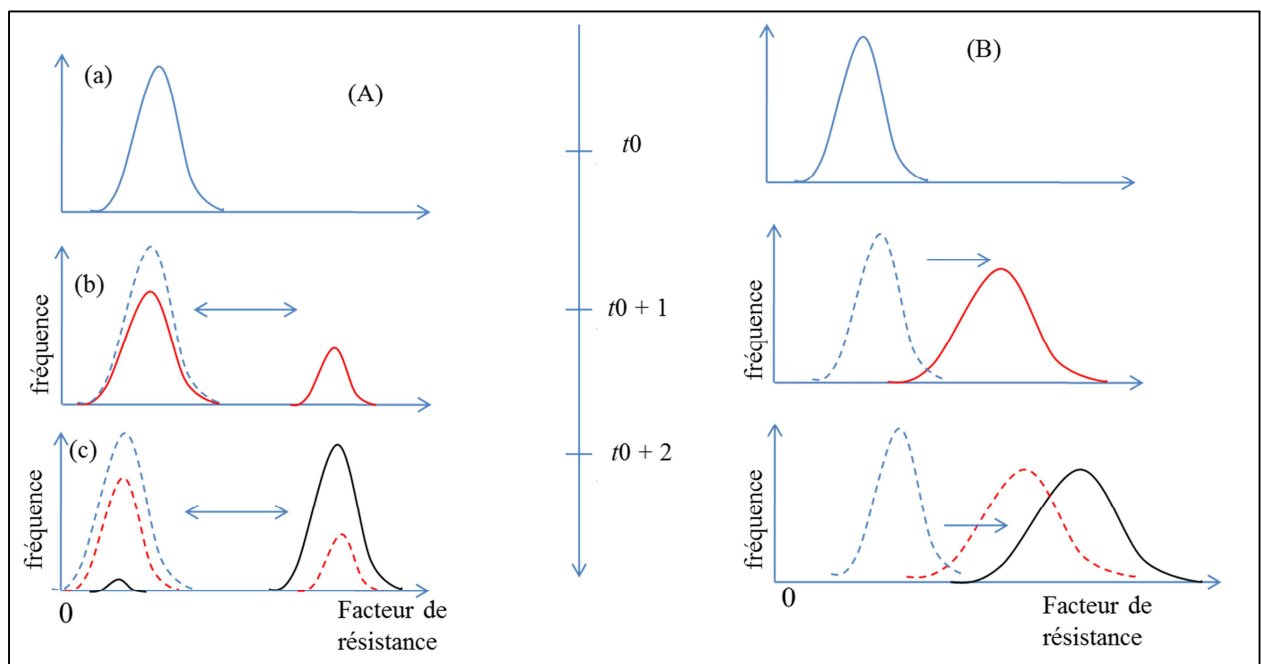
##### 4.2.2- La sélection directionnelle

Dans d'autres cas, un ensemble de mutations (sur plusieurs gènes ou sur un même gène) se traduisant par des niveaux de résistance variables. Ainsi, la fitness des individus en présence du fongicide est ici un trait quantitatif. On ne parle pas ici d'individus résistants et on observe des niveaux de résistance intermédiaires et graduels entre les individus dont la sensibilité au fongicide est fortement altérée et les individus sensibles (encadré 1B). Dans ce cas, l'effet de la sélection se traduit par un changement de la valeur moyenne du trait pour l'ensemble de la population. C'est ainsi que procède la sélection dans le cas des fongicides inhibiteurs de biosynthèse de l'ergostérol

du groupe des DMI (encadré 1B) (Georgopoulos and Skylakakis, 1986; Broodie III *et al.*, 1995; Kingsolver and Pfennig, 2007).

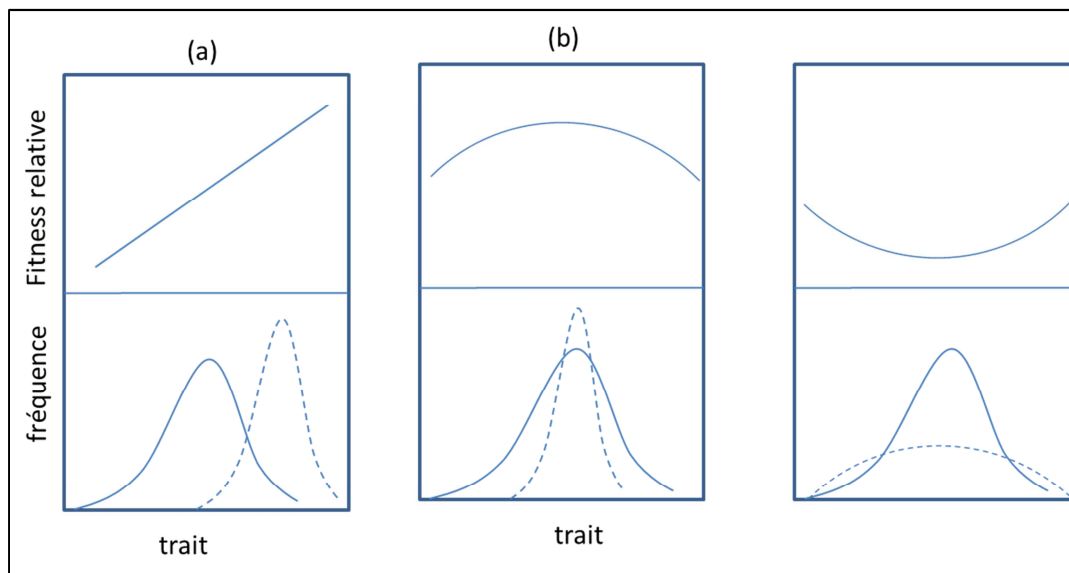


**Fig. 8.** La dynamique d'évolution de la résistance en présence et en absence de fongicide. la croissance (A) et le diminution (B) de la résistance sont caractérisés par l'apparition et la compétition entre les souches résistantes et sensibles, et les processus évolutifs peuvent en différentes phases (Source: zur Wiesch *et al.*, 2011)



**Encadré 1: les différents types de résistance et les modes de sélection :** Développement de la résistance fongicide contrôlée en fonction du nombre de gènes impliqués : à

**gauche**, la schématisation de l'évolution de la population lorsque la résistance est contrôlée par un gène majeur (résistance qualitative ou discrète). (a) Dans les conditions initiales au temps  $t_0$  la population non traitée (ligne bleue) est sensible; (b) avec l'application des traitements à  $t_0+1$  il y a une séparation en deux de la population (ligne rouge) avec d'un côté les résistants avec des facteurs de résistance (FR) et de l'autre les sensibles de faible FR; (c) à  $t_0+2$  la fréquence des résistants est extrêmement élevée dans la population (ligne noire). **À droite**, la schématisation de l'évolution de la population lorsque la résistance est contrôlée par plusieurs gènes (résistance quantitative ou continue). Avec l'application des traitements  $t_0+1$ , il y a une augmentation progressive du FR et de la variance autour de la moyenne dans la population entière aboutissant à  $t_0+2$  à une moyenne FR le plus élevé de la population et composé de plusieurs individus à FR intermédiaires entre les résistants et les sensibles. les lignes interrompues indiquent l'état précédent de la population (Georgopoulos & Skylakakis 1986, Scheinpflug 1987).



**Encadré 2 : Les différents modes de sélection (Broodie III *et al.*, 1995).** (a) **la sélection directionnelle**: c'est une sélection linéaire pour les fortes et faibles valeurs de phénotypiques, détectée par une association entre la moyenne du trait et la fitness. Elle augmente (positive) et diminue (négative) la moyenne du trait. (b) **la sélection stabilisante**: sélection concave non linéaire contre les phénotypes extrêmes, détectée par une relation négative entre le second moment de la distribution et la fitness. Ce mode de sélection décroît la variance du trait. (c) **la sélection disruptive**: à l'opposé de la sélection stabilisante, sélection convexe non linéaire contre les phénotypes intermédiaires détectée par une relation positive entre le second moment de la distribution et la fitness. La sélection disruptive augmente la variance du trait.

#### 4.3- Le coût de la résistance

Lors du processus de sélection, le nouvel (les nouveaux) allèle(s) sélectionné(s) aura(ont) l'effet d'augmenter dans la population la proportion d'individus adaptés à un nouvel environnement dans lequel le fongicide est présent. Toutefois, la présence de ces mutations peut également être accompagnée d'un effet négatif ou pléiotrope sur d'autres caractères. On parle dans ce cas de coût adaptatif ou encore de coût de la résistance (Labbé, 2005). Par exemple, une mutation peut rendre une enzyme moins affine pour ses inhibiteurs mais aussi moins affine pour son substrat. Dans ce cas, on s'attend théoriquement à ce que les individus résistants soient moins compétitifs en absence de fongicide et disparaissent de la population dès le retrait de la pression de sélection. De nombreuses études ont été menées pour évaluer s'il y avait un coût de la résistance chez différents couples fongicides/pathogènes (Tableau 6). Elles ont permis de comprendre pourquoi chez divers pathogènes, les souches résistantes à certains fongicides restent souvent persistantes au champ malgré l'absence prolongée des traitements (Georgopoulos and Skylakakis, 1986; Brent *et al.*, 1998). Le coût de la résistance s'exprime différemment si les mécanismes génétiques de la résistance impliquent une altération de la fonction d'un régulateur de réactions de biosynthèses tel que l'enzyme *cyp51* pour le DMI ou alors de la structure d'un organe ou autre structure cellulaire tels que le cytochrome b pour les QoI ou la  $\beta$ -tubuline pour les MBC.

##### 4.3.1- Cas des MBC

Pour les MBC, la mutation sur le gène de la  $\beta$ -tubuline permet au champignon de continuer à produire des microtubules vitales en présence de fongicide. Plusieurs études ont été réalisées en conditions contrôlées pour évaluer la compétitivité des souches résistantes en présence de souches sensibles aux MBC afin de déduire un coût de la résistance chez *Botrytis cinerea*, *V. inaequalis*, *M. fijiensis*, *Penicillium expansum*, *Fusarium graminearum* et *Cercospora betticola* (McGee and Zuck, 1981; Schüepp and Künig, 1981; Raposo, 1996; Romero, 1998; Baraldi *et al.*, 2003; Kinay *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009; Malandrakis *et al.*, 2013). Aucune de ces études n'a permis de montrer un coût de la résistance chez les individus résistants (Tableau 6). Cette absence de coût semble signifier que la  $\beta$ -tubuline mutée est capable d'assurer pleinement sa fonction vitale.

##### 4.3.2- Cas des QoI

Pour les QoI, la mutation G143A sur le gène du cytochrome b permet au champignon de continuer de respirer en présence du fongicide. Comme pour les MBC, dans la majorité des cas il n'y a pas de perte de fitness connue chez les résistants aux QoI en absence du fongicide (Tableau 6). Cela a été montré par exemple chez *Alternaria solanii*, *E. graminis*, *Magnaporthe grisea* et *M.*

*graminicola* (Chin *et al.*, 2001; Avila-Adame and Köller, 2003; Aqeel *et al.*, 2008; Pasche and Gudmestad, 2008; Roohparvar *et al.*, 2008; Corio-Costet *et al.*, 2011). Un coût de la résistance a été toutefois observé chez certaines souches de *C. betticola* et *B. cinerea* résistantes à la pyraclostrobine pour lesquelles la résistance avait été induite par mutagenèse (Malandrakis *et al.*, 2006; Markoglou *et al.*, 2006). Chez ces individus, tous les traits d'agressivité évalués ont exprimé une perte de fitness. Chez *P. viticola* la sporulation est également plus faible chez les individus résistants à l'azoxystrobine, ce qui traduit également un coût de la résistance chez ce champignon (Genet *et al.*, 2006).

#### 4.3.3. Cas des DMI

Dans la majorité des cas un coût de la résistance aux DMI a été constaté chez divers pathogènes en absence de DMI (Tableau 6). C'est le cas par exemple chez *C. betticola*, *E. graminis fsp tritici*, *Monilia fructicola*, *P. digitatum*, *Sclerotinia homoeocarpa*, *V. inaequalis* (Al-Mughrabi and Gray, 1995; Holmes and Eckert, 1995; Köller *et al.*, 1997; Hsiang *et al.*, 1998; Karaoglanidis *et al.*, 2001; Karaoglanidis and Thanassouloupoulos, 2003; Moretti *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2008; Hamada *et al.*, 2011; Karaoglanidis *et al.*, 2011). Des traits d'agressivité comme la croissance mycélienne, la sporulation, la taille de lésions, le nombre de lésions et la germination peuvent être affectés chez les souches ayant un niveau de sensibilité réduit aux DMI. Dans le cas de la résistance aux DMI, il y a plusieurs mutations et insertions sur le gène *cyp51*, et la combinaison de ces différentes mutations et insertions peut provoquer des variations de l'affinité de l'enzyme avec son substrat. Ces différentes modifications de l'enzyme pourraient ainsi altérer sa fonction de catalyseur et donc perturber la synthèse de l'ergostérol. Si ces mutations confèrent un avantage en présence du fongicide, il semble qu'en absence du fongicide elles représentent un coût pour les individus porteurs de ces mutations.

Tableau 6 : récapitulatif des cas perte de la fitness sur des traits d'agressivité chez divers pathogènes relative à un cout de la résistance aux QoI, MBC et DMI.

Groupe de fongicides	Fongicides	Espèces pathogènes	Perte fitness	Traits évalués	Traits affectés	Informations particulières	Auteurs
QoI	Azoxystrobine	<i>Alternaria solanii</i>	Non	Taille et nombre de lésions, germination		réduction de la germination <i>in vitro</i> , inoculation <i>in vivo</i>	Pasche et Gudmestad 2008
	Trifloxystrobine	<i>Erysiphe graminis fsp tritici</i>	Non	Nombre de colonie		mixture SS/SR* sur 3 générations <i>in vitro</i>	Chin <i>et al.</i> , 2001
	Pyraclostrobine	<i>Botrytis cinerea</i>	Oui	croissance germinative, taille de lésions, sporulation et germination <i>in vivo</i> , production de sclérote	croissance germinative, taille de lésions, sporulation germination <i>in vivo</i> , production de sclérote	Mutagenèse induite, compétitivité SS <i>in vivo et in vitro</i>	Markoglou <i>et al.</i> , 2006

	Pyraclostrobine	<i>Cercospora beticola</i>	Oui	croissance mycélienne, sporulation, taille de lésion	croissance mycélienne, sporulation, taille de lésion	<i>In vivo</i> et <i>in vitro</i> sur 4 générations Mutagenèse induite effet pléiotrope	Malandrakis <i>et al.</i> , 2006
	Azoxystrobine	<i>Plasmopara viticola</i>	Oui	Sporulation	Sporulation	<i>In planta</i> après 5 générations	Genet <i>et al.</i> , 2006
	Azoxystrobine	<i>Magnapotha griseae</i>	Non	germination, sporulation, nombre de lésions, croissance germinative		<i>In vivo</i> et <i>in vitro</i>	Avila-Adame et Koller, 2003
	Trifloxystrobine	<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Non	nombre de lésions		rôle de transporteurs membranaires MFS, <i>in planta</i>	Roohparvar <i>et al.</i> , 2008
	Famoxadone	<i>Plasmopara viticola</i>	Non	durée de latence, sporulation, nombre de lésions		mixture de SR/SS	Corio-Costet <i>et al.</i> , 2011
MBC	Thiabendazole	<i>Penicilium digitatum</i>	Non	croissance mycélienne couleur de la colonie, taille de lésion, délai de sporulation		<i>In vivo</i> et <i>in vitro</i> mixture SS/SR, 4 cycles de maladie	Kinay <i>et al.</i> , 2006
	Benomyl	<i>Cercospora beticola</i>	Non	Croissance mycélienne et sporulation, germination nombre de lésions		<i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> , mixture SS/SR sur plusieurs cycles de maladie,	Ruppel E.G. 1975
	Carbendazim	<i>Fusarium graminearum</i>	Non	croissance germinative, germination et nombre de lésions		<i>In vivo</i> et <i>in vitro</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007
	Benomyl	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Non	Croissance mycélienne, durée d'incubation, nombre de lésions		<i>In vivo</i> et <i>in vitro</i> mixture de SR/SS	Romero et Sutton 1998
	Thiabendazole	<i>Penicilium expansum</i>	Non	germination, croissance mycélienne, taille de lésions, sensibilité stress osmotique		<i>In vivo</i> et <i>in vitro</i>	Baraldi <i>et al.</i> , 2003
	Benzimidazole	<i>Venturia inaequalis</i>	Non	Sporulation Germination		<i>In vitro</i> <i>in vivo</i> mixture SR/SS, 8 cycles de sporulation sur graine	McGee, et Zuck, 1981
	Benzimidazole	<i>Botrytis cinerea</i>	Non	croissance germinative		<i>In vitro</i>	Shüepp et Küng, 1981
	Carbendazim, benomyl	<i>Botrytis cinerea</i>	Non	taille de lésions, sporulation		<i>In vivo</i> et <i>in vitro</i>	Raposo <i>et al.</i> , 1996
	Benzimidazole	<i>Penicilium expansum</i>	Non	Croissance mycélienne, sporulation, taille de lésions, production de mycotoxines		<i>In vivo</i> et <i>in vitro</i>	Malandrakis <i>et al.</i> , 2013
	Tebuconazole	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Non	Taille de lésions, croissance mycélienne		<i>In vitro</i> <i>in vivo</i>	Ma <i>et al.</i> , 2002
DMI	Tetraconazole	<i>Cercospora beticola</i>	Oui	croissance germinative, sporulation et germination <i>in vivo</i> nombre de lésion	croissance germinative, nombre de lésions	inoculation <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> , compétitivité SS	Moretti <i>et al.</i> , 2003

Flutriafol	<i>Cercospora betticola</i>	Oui	croissance mycélienne, germination, sporulation, croissance germinative, durée d'incubation et nombre de lésions	nombre de lésions et sporulation	<i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> , 4 cycles de maladie compétitivité SS en laboratoire et au champ virulence SS	Karaoglanidis <i>et al.</i> 2001
Flutriafol	<i>Cercospora beticola</i>	Oui	Stress repiquage successif, croissance mycélienne, sensibilité au froid, germination	Germination, croissance mycélienne, sensibilité au froid	culture successives <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> , effet du froid	Karaoglanidis et Thanassoulou 2002
Triadiméfon	<i>Erysiphe graminis fsp tritici</i>	Oui	Taille de lésions	Taille de lésions	absence de pression de sélection <i>in vivo</i> , compétitivité SS	Al-Mughrabi K.I. et Gray 1995
Propiconazole	<i>Monilia fructicola</i>	Oui	période de latence, croissance mycélienne, sporulation, stress au froid, sensibilité stress repiquages successifs et germination	durée de latence, croissance mycélienne, sporulation, stress au froid, sensibilité stress repiquages successifs et germination	<i>In vitro in vivo</i> , plusieurs sous cultures successives affectent la fitness	Luo <i>et al.</i> , 2007
Imazalil	<i>Penicilium digitatum</i>	Oui	sporulation, croissance mycélienne, durée de latence sur fruit	sporulation, croissance mycélienne, durée de latence sur fruit	<i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> , mixture SS/SR, plusieurs cycles de maladie	Holmes et Eckert. 1995
Propiconazole / triadimenol	<i>Pyrenophora teres</i>	Non	durée de latence, sporulation			Peever et Milgroom 1994
Propiconazole	<i>Sclerotinia homoeocarpa</i>	Oui	Croissance mycélienne, nombre de lésions, taux de croissance de lésions	nombre de lésions	<i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	Hsiang <i>et al.</i> , 1998
Flusilazole	<i>Venturia inaequalis</i>	Oui	Croissance mycélienne, sensibilité repiquage successif, sensibilité au froid	sensibilité au froid, sensibilité repiquage successif	10 mois de sous cultures <i>in vitro</i>	Koller <i>et al.</i> , 1991
Tebuconazole	<i>Penicilium expansum</i>	Oui	croissance mycélienne, taille de lésions, forme de lésions, production de patulin	croissance mycélienne, taille de lésions, forme de lésions, production de patulin	<i>In vitro in vivo</i>	Karaoglanidis <i>et al.</i> 2011
Imazalil	<i>Penicilium digitatum</i>	Oui	croissance mycélienne couleur de la colonie, taille de lésion, délai de sporulation	couleur de la colonie	4 cycles de maladie compétitivité SS, <i>In vitro in vivo</i>	Kinay <i>et al.</i> , 2006
Difenoconazole	<i>Rhizoctonia cerealis</i>	Non	Sensibilité stress osmotique, nombre de lésions, croissance mycélienne		<i>In vitro in vivo</i> mutagenèse induite, 10 générations	Hamada <i>et al.</i> , 2011

\*SS : souches sensibles ; SR : souches résistantes

## 5- La mesure des paramètres liés à la sélection

Afin de mettre en place des stratégies efficaces de régulation de la résistance il est nécessaire d'intégrer l'ensemble des différents facteurs (forces évolutives, facteurs climatiques) impliqués dans son développement pour prédire son évolution dans des approches modèles (Hall *et al.*, 2004). Pour alimenter ces modèles il faut donc quantifier les différents paramètres liés à ces différents facteurs. La sélection par les fongicides jouent un rôle majeur dans le développement de la résistance et se caractérise par la différence du taux de croissance des résistants et des sensibles (Milgroom *et al.*, 1989 ; Ennos and McConnell, 1995). Peu d'études se sont intéressés à l'effet de la sélection et de la contre sélection par les fongicides. Deux types d'approches ont été menés pour mesurer les effets de la sélection, des approches expérimentales en conditions contrôlées ou au champ. Le principe général de ces approches est de relier des fluctuations de la fréquence des individus résistants à l'application d'une pression de sélection par les traitements fongicides.

Dans les conditions contrôlées on a une meilleure maîtrise de la composition des populations et des conditions environnementales. Les populations sont composées de manière artificielle en nombre d'individus et en types résistants et sensibles. Pour mesurer la sélection ou la contre sélection les souches résistantes et sensibles sont généralement mélangées artificiellement à différentes proportions et inoculées sur des hôtes ou des milieux de culture en présence ou en absence de fongicide. On détermine ensuite un coefficient de sélection en comparant la structure génétique après plusieurs générations. Les mesures dans les conditions contrôlées permettent de se mettre à l'abri d'autres forces évolutives extérieures telles que la migration, mais ne reflètent pas toujours la réalité du terrain dans laquelle le pathogène effectue tout son cycle biologique.

Peu de travaux ont mesuré la sélection et la contre sélection au champ à cause de la difficulté de mise en œuvre des expériences (Milgroom *et al.*, 1989; Ennos and McConnell, 1995; Hall *et al.*, 2004). Dans les conditions au champ, on a une maîtrise relativement faible de la composition des populations et des conditions environnementales, mais ces études présentent l'avantage d'intégrer les différents facteurs biotiques et abiotiques présents ainsi que tous les paramètres du cycle biologique du champignon. Au champ les inoculations peuvent être réalisées à l'aide de contaminations naturelles sur des plantes hôtes ou à partir d'un inoculum préparé artificiellement. On peut se mettre à l'abri de flux de gènes en s'éloignant des foyers d'infections potentiels à une distance déterminée en fonction de la distance de dispersion du champignon.

### 5.1- La mesure de la sélection pour la résistance qualitative

Pour la résistance qualitative, c'est la dynamique de l'évolution de la fréquence allélique au cours du temps qui permet de mesurer le coefficient de sélection. Toutefois, la condition nécessaire est que ce marqueur soit indépendant des autres locus du génome, c'est-à-dire à l'équilibre gamétique avec ces



locus comme ce qui est attendu dans des populations panmictiques (Milgroom *et al.*, 1989; Ennos and McConnell, 1995; Barton *et al.*, 2007).

Les processus de croissance et de diminution de la résistance sont caractérisés par la compétition permanente entre les souches résistantes et sensibles. La fitness d'un génotype est alors relative par rapport à celle de l'autre : on parle alors de fitness relative (Barton *et al.*, 2007). En présence de fongicide si on suppose qu'un génotype résistant a une fitness de 1, la fitness du génotype sensible est  $(1 - s)$ ,  $s$  étant le coefficient de sélection (Leonard, 1977; Milgroom *et al.*, 1989; Ennos and McConnell, 1995; zur Wiesch *et al.*, 2011). Le coefficient de sélection représente également la différence de taux de croissance du génotype résistant par rapport au génotype sensible (Milgroom *et al.*, 1989). La fréquence d'un allèle résistant  $p$  à un temps  $t$  peut être exprimée en fonction de sa fréquence  $p_0$  au temps initial, selon l'équation :

$$\frac{p}{1-p} = \frac{p_0}{1-p_0} e^{st}$$

où  $p$  est la fréquence de l'allèle résistant à un temps  $t$ ,  $p_0$  la fréquence de l'allèle au temps initial,  $s$  le coefficient de sélection.

#### 5.4- Mesure expérimentale de la sélection sur des traits quantitatifs

Pour la résistance quantitative, plusieurs gènes ou mutations sont impliqués pour l'expression du phénotype observé. Contrairement au cas de la résistance à gène majeur, il est extrêmement difficile de suivre les fréquences alléliques de tous les gènes ou mutations qui influencent le phénotype, et les effets de chaque allèle sur la fitness (Barton *et al.*, 2007). Ici on suit l'évolution de la valeur d'un trait quantitatif au cours du temps pour quantifier la sélection. Dans le cas d'une sélection directionnelle, comme c'est ici le cas, la relation entre la fitness des individus et la valeur du trait soumis à sélection est linéaire, et la pente de cette relation est définie comme étant le gradient de sélection  $\beta$ . Ce gradient montre comment les survivants dépendent du trait étudié dans une population donnée (Barton *et al.*, 2007). Cette relation est décrite par Kingsolver et Pfennig (2007) par l'équation :  $Z_{\text{après}} - Z_{\text{avant}} = Va \beta$  où  $Z_{\text{avant}}$  et  $Z_{\text{après}}$  sont les valeurs moyennes du trait avant et après la sélection ;  $Va$  la variance génétique additive ;  $\beta$  le gradient de sélection.

## 6- Le pathosystème : *Mycosphaerella fijiensis* et le bananier

### 6.1- Le bananier

#### 6.1.1- Description botanique

Le bananier est la plus grande plante herbacée (Karamura and Karamura, 1995) (Fig. 9). Sa partie souterraine communément appelée rhizome, corme ou bulbe est en fait la vraie tige du bananier. A partir de la vraie tige se développent le système vasculaire, les parties aériennes et souterraines

(Skutch, 1932). Dans la partie souterraine, les racines qui émergent du bulbe sont composées de racines principales, secondaires et de poils absorbants pouvant aller jusqu'à 40-60 cm de profondeur et atteindre 3-4 m de long (Price, 1995). Dans la partie aérienne, le pseudo-tronc ou fausse tige est constitué de gaines foliaires serrées, pouvant atteindre 2 à 8 m de haut pour les cultivars et 10 à 15 m pour les espèces sauvages (Karamura and Karamura, 1995). Les gaines foliaires se forment à partir du sommet de la vraie tige et supportent le pseudo-tronc. A l'aisselle de chaque gaine, se trouve un bourgeon axillaire susceptible de donner naissance à un rejet. Le rejetonnage est le mode naturel de reproduction des variétés cultivées. Au niveau du sommet du pseudo-tronc, les gaines foliaires deviennent plus étroites et forment les pétioles portant des feuilles. Chaque plante développe environ 30 à 40 feuilles au cours de son cycle et chez la plupart des variétés elles sont émises à un rythme hebdomadaire. Lorsque la dernière feuille est émise, l'inflorescence croît au centre du pseudo-tronc et débouche à l'air libre au milieu du bouquet foliaire. Elle évolue selon le phénomène de géotropisme chez les cultivars, formant un U renversé pour ramener le régime final en pendule (Karamura and Karamura, 1995). L'inflorescence appelée régime est un épi constitué de grappes (mains) de fleurs mâles et femelles, insérées sur la hampe par des coussinets. Les fleurs femelles prennent rapidement du volume et deviennent des fruits (partie comestible). Les fleurs mâles, plus petites, forment au niveau de la base un bourgeon floral à croissance indéfinie encore appelé "popote".

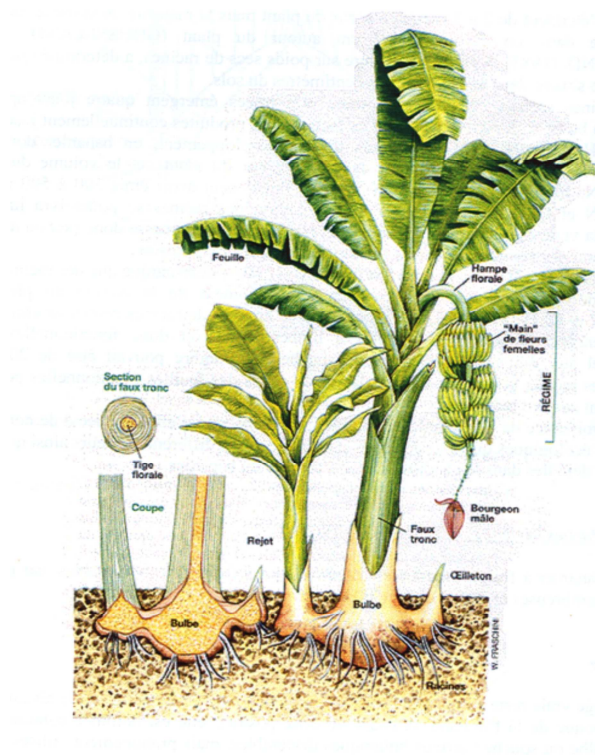
#### 6.1.2- Origine, et classification des bananiers

Les bananiers sont originaires d'Asie du Sud-Est. Ils appartiennent à la famille des Musaceae, ordre des Zingibérales ou Scitaminales, classe des Monocotylédones (Stover and Simmonds, 1987). Les Musaceae comprennent deux genres : le genre *Musa* et le genre *Ensete*. Dans le genre *Musa*, la section *Eumusa* comprend plusieurs espèces dont les plus importantes sont *Musa acuminata* et *Musa balbisiana*. Les cultivars des bananiers sont diploïdes, plus généralement triploïdes et plus rarement tétraploïdes. Tous les bananiers cultivés sont parthénocarpiques et dérivent de l'espèce *M. acuminata* ou du croisement entre *M. acuminata* (génome noté A) et *M. balbisiana* (génome noté B) (Swennen and Vuylsteke, 1987). On distingue deux types d'utilisation, des bananes de type dessert et les bananes à cuire. Ces bananiers se répartissent dans les groupes génomiques suivants AA, AAA, AB, AAB et ABB (Tableau 7) (Tomekpe, 1996).

#### 6.1.3- Les principaux bio-agresseurs des bananiers

La production des bananes et plantains est entravée par de multiples contraintes biotiques. Parmi les contraintes biotiques les plus importantes, on distingue les dégâts des ravageurs de l'appareil souterrain tels que des nématodes (notamment *Radopholus similis*) et le charançon noir du bananier (*Cosmopolites sordidus*); de multiples virus comme le banana streak virus (BSV) et banana bunchy top virus (BBTV) ; des bactérioses comme la maladie de moko (*Ralstonia solanacearum*) ; des maladies fongiques comme la maladie de Panama (*F. oxysporum* fsp cubense), des maladies de conservation

comme l'anthracnose (*Colletotrichum musae*), les cercosporioses parmi lesquelles la cercosporiose noire ou maladie des raies noires (MRN) (*M. fijiensis*) et la cercosporiose jaune ou maladie de sigatoka (MS) (*M. musicola*). Parmi toutes ces contraintes parasites, la MRN est la contrainte parasitaire la plus importante des cultures de bananiers pour l'exportation (de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2010).



**Fig. 9.** Vue schématique d'un bananier à la fructification et de ses rejets (Champion, 1967)

Tableau 7 : Différents types de bananiers cultivés à fruits comestibles

Groupe génomique	Sous-groupe	Type
AA	Sucrier	Dessert
	Pisang berangan	Dessert
	Lakatan	Dessert
AAA	Gros Michel	dessert
	Cavendish	dessert
	Figue rose	dessert
	Lujugira-mutika	à cuire, à bière
	Ibota	dessert
AB	Ney poovan	Dessert
AAB	Figue pomme	dessert
	Pome prata	dessert
	Mysore	dessert
	Pisang kelat	Mixte
	Pisang rajah	Mixte
	Plantain	à cuire
	Popoulou-mia moali	à cuire
	Laknao	à cuire
	Iholena	à cuire

---

ABB	Bluggoe	à cuire
	Monthan	à cuire
	Pelipita	à cuire
	Pisang awak	Dessert
	Peyan	à cuire
	Saba	à cuire

---

Source : (Tomekpe, 1996)

## 6.2- La MRN

### 6.2.1- L'agent pathogène : Description taxonomique, origine et répartition mondiale

*Mycosphaerella fijiensis* Morelet est un champignon aérien ascomycète, haploïde et hétérothallique appartenant à la famille des *Mycosphaerellaceae* (Jones, 2000). *M. fijiensis* produit des ascospores bicellulaires à partir des périthèces, tandis que sa forme anamorphe *Paracercospora fijiensis* Deighton (Deighton, 1976) produit des conidies pluricellulaires de 1 à 10 segments à partir de conidiophores émergeant des stomates (Fig. 10) (Jones, 2000). La morphologie de *P. fijiensis* permet de le distinguer de *Pseudocercospora musae* agent causal de la MS (Meredith, 1969) et des autres espèces du genre *Mycosphaerella* inféodées au bananier.

*M. fijiensis* a été identifié pour la première fois aux îles Fidji en 1963 (Carlier *et al.*, 1996; Jones, 2000). *M. fijiensis* s'est rapidement répandu à d'autres zones productrices dans le monde avec la diffusion du matériel végétal (Carlier *et al.*, 2000). A partir de son centre d'origine du Sud-Est asiatique *M. fijiensis* a connu deux expansions continentales rapides qui se sont toujours traduites par le remplacement du *M. musicola* qui était auparavant l'espèce prévalente. Un développement rapide de cette maladie a été observé en Amérique Latine où *M. fijiensis* a été décrit pour la première fois au Honduras en 1972. La MRN est aujourd'hui présente sur la quasi-totalité de la zone tropicale du continent américain (Carlier *et al.*, 2000). La plus récente introduction dans cette zone concerne la région Caraïbe avec notamment l'arrivée récente en Martinique (2010) puis en Guadeloupe (2012) (de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2010). *M. fijiensis* a été introduit en Australie en 1983 et y a été complètement éradiqué (Henderson *et al.*, 2006). Dans sa deuxième expansion sur le continent africain, *M. fijiensis* est décrit d'abord en Zambie en 1973, puis s'est répandu à plusieurs pays d'Afrique (Afrique de l'Est, Afrique de l'Ouest, Afrique centrale) (Carlier *et al.*, 2000). Au Cameroun, *M. fijiensis* a été signalé pour la première fois en 1981 (Fouré, 1984). La maladie s'est ensuite répandue aux principales zones de production de bananes d'exportation et a totalement remplacé *M. musicola* (Mouliom-Pefoura, 1999).

### 6.2.2- Le cycle épidémique

Le champignon effectue la totalité de son cycle biologique sur le bananier. Cinq grandes phases caractérisent le cycle biologique de base observé lors d'une réaction parasitaire compatible entre le bananier et *M. fijiensis* : la contamination, l'incubation, le développement des symptômes, la sporulation et la dissémination de l'inoculum secondaire (Fig. 11) (Fouré and Moreau, 1992; Jones, 2000; Churchill, 2011).

#### - *La phase de contamination*

La contamination est fortement influencée par les conditions climatiques et comporte différentes étapes: la pollution (dépôt de la spore sur la feuille), la germination, une période de croissance épiphyllé et enfin la pénétration stomatique dans l'hôte (Fig. 11). La contamination peut être réalisée aussi bien par les ascospores que par les conidies (Fouré, 1984). Le dépôt de la spore a lieu à différents stades de développement mais principalement sur le cigare (la feuille encore enroulée) et la première feuille complètement déroulée. Par la suite l'efficacité contaminatrice diminue avec l'âge de la feuille ce qui explique la répartition des symptômes sur la feuille et le gradient de la maladie en fonction de l'âge de la feuille (Fig. 12) (Gauhl, 1994). Les spores germent 2 à 3 heures après le contact avec une surface humide (Stover, 1980; Fouré and Moreau, 1992; Churchill, 2011) (Fig. 13). Les filaments germinatifs issus des spores rampent à la surface des feuilles pendant 4 à 6 jours. La pénétration peut se produire sur les deux faces du limbe foliaire, mais elle s'effectue plus généralement du côté inférieur où les stomates existent en plus grand nombre et demeurent plus longtemps ouverts (Churchill, 2011). La pénétration des filaments à travers les stomates se fait en présence d'une humidité saturante (Fouré and Moreau, 1992).

#### - *Période d'incubation*

La période d'incubation commence avec la pénétration du champignon et se termine avec l'apparition des premiers symptômes de la maladie et semble inversement proportionnelle à la quantité d'inoculum déposé sur les feuilles (Fouré, 1984; Fouré and Moreau, 1992). Elle est également fonction des conditions climatiques et donc des saisons. La durée d'incubation la plus rapide en conditions favorables est de 10 à 14 jours mais varie considérablement en fonction des variétés hôtes (Fouré, 1984). Dans le cas de la MRN la période d'incubation correspond également à la latence conidienne. Dans la région du Mounjo (Cameroun), les durées d'incubation les plus courtes (13-16 jours) ont été obtenues entre mai et novembre, période plus favorable à la maladie, tandis que la plus longue a été obtenue en février (26 jours) (Fouré and Moreau, 1992).

#### - *Le développement des symptômes*

Après apparition des premiers symptômes, l'évolution de la maladie se poursuit jusqu'au stade ultime de développement des lésions suivant l'échelle de (Fouré, 1984):

Stade 1 : Point de dépigmentation de couleur blanchâtre ou jaune non visible à la lumière transmise, observable uniquement à la face inférieure de la feuille ; ce point devient progressivement brun rouge, de diamètre inférieure à 1mm, visible sur la face inférieure de la feuille (Fig. 14A).

Stade 2 : Ce point s'allonge et s'élargit pour former un tiret brun rouille parallèle aux nervures secondaires mesurant 2 mm de longueur sur 1 mm de largeur (Fig. 14B). Stade 3 : Le tiret continue à s'allonger et devient brun foncé à noir. Il est bien visible à la face supérieure du limbe (Fig. 14B). Stade

4 : Le tiret s'élargit en une tache ronde ou elliptique entourée d'une zone marron clair (Fig. 14B). Stade

5 : Le centre noir de la tache se déprime et les bordures deviennent plus nettes et s'entourent d'un halo jaunâtre (Fig. 14C). Stade 6 : Le stade ultime de l'infection est une tache grise avec un anneau noir entouré d'un halo jaune vif (Fig. 14C et D).

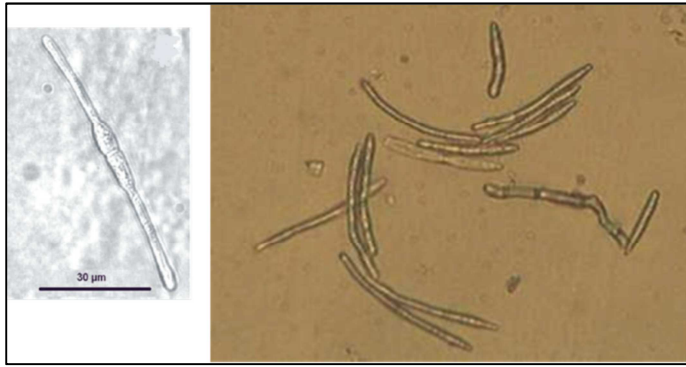
Il existe des variations importantes dans la durée d'évolution des lésions, et il s'avère que cette vitesse d'évolution des taches est liée aux mêmes facteurs qui régissent la durée de l'incubation, c'est-à-dire la quantité d'inoculum et le climat (Brun, 1963). En cas de fortes attaques il y a une coalescence rapide des symptômes qui accélère l'évolution des symptômes vers les stades nécrotiques (Fig. 14E) (Fouré and Moreau, 1992).

#### - *La sporulation*

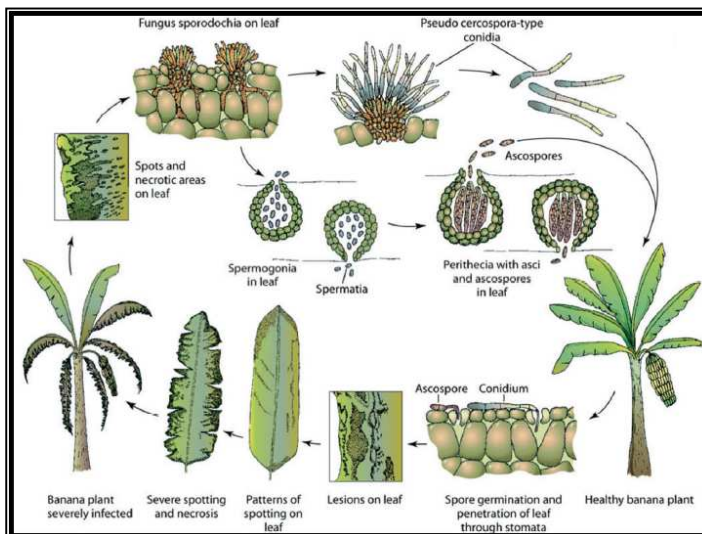
Les conidies, issues de la reproduction asexuée, sont produites à l'apex de conidiophores présents sur des lésions de jeunes stades (stades 2 à 4) pendant un temps relativement court (Fouré and Moreau, 1992). Les spermogonies se développent tardivement, lorsque les tirets deviennent des taches et sont plus abondantes sur la face inférieure de la feuille. Ces spermogonies contiennent des spermaties hyalines et rougeâtres qui jouent le rôle de gamète mâle dans le cycle du pathogène (Jones, 2000; Churchill, 2011). Le développement des ascospores est mal connu chez les pathogènes des bananiers du genre *Mycosphaerella*. Toutefois les ascospores sont issues de la rencontre et la fusion de mycéliums à polarité différentes (+ et -). Les deux types sexuels (+ et -) sont haploïdes parce que la fécondation est directement suivie d'une méiose (Jones, 2000; Churchill, 2011).

#### 6.2.3- *La dispersion des spores*

Les conidies sont décrochées passivement des conidiophores par le vent et les eaux de pluies. Elles sont lourdes et dispersent à de courte distance de l'ordre de quelques dizaines de mètres sur un événement de dispersion (Churchill, 2011; Rieux *et al.*, 2013). Elles contribuent à la contamination de la plante mère au rejet et d'une plante à une autre. Les ascospores sont plus petites, plus légères que les conidies et de forme aérodynamique. Elles sont propulsées des périthèces et dispersent par le vent à des distances de plusieurs kilomètres (Rieux *et al.*, 2013) et jouent ainsi un rôle très important dans la dissémination du champignon à l'échelle d'un bassin de production ou d'un pays (Amil *et al.*, 2007; Churchill, 2011).



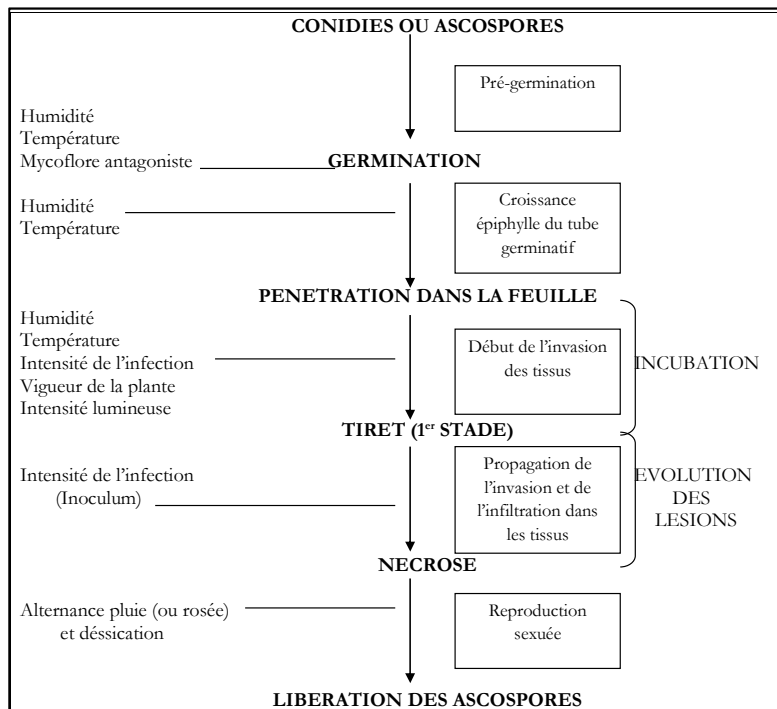
**Fig. 10.** Les spores de *Mycosphaerella fijiensis*, (A) une ascospore bicellulaire, (B) des conidies multicellulaires (*source*: Churchill, 2011)



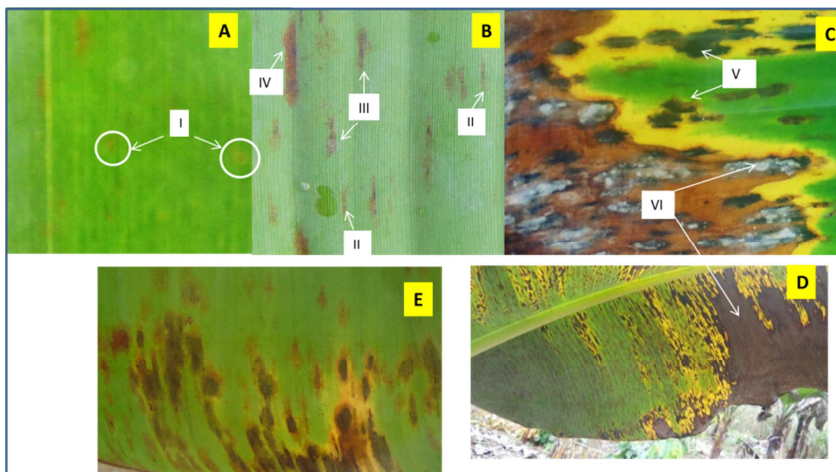
**Fig. 11.** Le cycle épidémiologique simplifié chez *M. fijiensis* montrant les cycles de reproductions sexué (ascospores) et asexué (conidie) lors des infections sur le bananier (*Source* Churchill, 2011)



**Fig. 12.** Schéma des étapes du développement de la feuille enroulée au stade cigar (*Source* : Jones 2000)



**Fig. 13.** Résumé des étapes de développement des cercosporioses et des principaux facteurs agissant sur ces étapes (*source* : Fouré, 1993).



**Fig. 14.** les différents stades de développement de la maladie des raies noires causée par *M. fijiensis*. (A) stade I, dépigmentation du limbe par un tiret de 1 mm; (B) stade II, allongement du tiret de 2-5 mm; stade III, élargissement du tiret prenant une couleur rouille, stade IV, le tiret s'élargi et s'allonge d'avantage atteignant sa taille maximum et devient visible sur la face supérieure de la feuille; (C&D) stade V, la lésion noirci puis au stade VI le centre de la lésion devient grisâtre; (E) en condition de forte attaques lors de pluies intenses, il y a une coalescence de jeunes lésions passant stade III au stade V provoquant de larges plages nécrotiques.



## **7- Importance économique et impact de la maladie sur la production des bananes et plantains**

### *7.1- Importance économique des bananes et plantains*

Avec 110 million de tonnes, les bananes et plantains constituent la première production fruitière mondiale (Lescot 2006, Lassoudière 2007). Elles sont consommées principalement sous forme de fruits frais dans le cas des bananes dessert, mais aussi sous forme cuite comme c'est le cas avec les plantains et autres bananes à cuire. La banane dessert destinée à l'exportation est essentiellement composée de quelques cultivars du sous-groupe Cavendish. Sa culture fait l'objet d'échanges commerciaux importants à l'intérieur d'une filière hautement organisée allant de la production, l'usinage dans les zones tropicales et subtropicales, le transport en bateau et la commercialisation des fruits sur le marché des pays importateurs. Dans cette filière, les bananes sont cultivées de manière intensive sur des grandes superficies (exemple : plus de 200 000 ha en Equateur) et font appel à une utilisation intensive d'intrants agricoles (pesticides, engrais). La production mondiale annuelle en circulation étant estimée à 17 million de tonnes, la culture de banane destinée à l'exportation constitue une source de revenus important pour les pays producteurs et emploie une main d'œuvre importante contribuant à la lutte contre le chômage (Loeillet, 2005). Par contre les plantains et autres bananes à cuire sont destinés à la consommation locale et sont cultivées de manière extensive dans les jardins de case et dans de petites exploitations paysannes (0,5 à 10 ha).

### *7.2- Impact de la MRN sur la production des bananes et plantains*

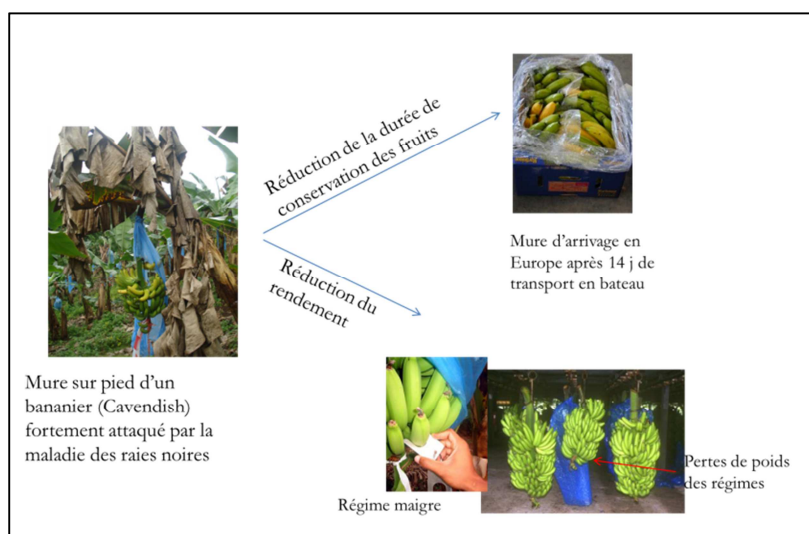
La MRN provoque un dessèchement plus ou moins généralisé du système foliaire. Elle affecte directement l'activité photosynthétique ce qui limite le remplissage des régimes, provoquant des pertes de rendement qui varient de 20 à 50 % (Stover, 1974; Mobambo *et al.*, 1996). Pour la banane export, l'objectif majeur est de préserver la qualité des fruits durant tout le processus de production de transport jusqu'à la commercialisation sur les marchés. La récolte de la banane doit alors répondre à des critères de qualités standards (Fig. 15) : (1) la banane doit être récoltée au grade commercial minimum (34 mm de diamètre du fruit mesuré sur la deuxième main à partir du haut du régime) qui est le critère de remplissage moyen du fruit et qui renseigne sur les rendements (poids) ; (2) la banane doit être récoltée à un stade de développement physiologique optimal qui permet de conserver les fruits à l'état vert au cours du transport jusqu'à l'arrivée dans les murisseries où ils seront muris artificiellement ; (3) la maturation homogène des fruits, le murissement se fait par lots de fruits arrivés à un stade de maturation homogène pour éviter des difficultés d'hétérogénéité lors du murissage. Dans la filière export, la MRN affecte ces critères de qualité et l'absence de contrôle empêche l'exportation des fruits.

### 7.2.1- La physiologie post récolte des bananes destinées à l'export

La banane est un fruit climactérique qui se caractérise par une production auto catalytique d'éthylène qui initie la maturation du fruit. Cette synthèse d'éthylène est précédée par une augmentation de l'activité respiratoire dite 'crise climactérique. La période entre la récolte et la crise climactérique, la phase pré-climactérique, est aussi appelée "durée de vie verte" (DVV) (Jullien *et al.* 2006). Dans la pratique en plantation, la priorité de la récolte est souvent donnée au grade commercial. Cependant, la récolte au grade expose de récolter des fruits avec une faible DVV lorsqu'il y a des stress de culture (Chillet *et al.*, 2009; Castelan *et al.*, 2013). En effet, sous certains stress de culture, les fruits peuvent prendre beaucoup de temps pour atteindre le grade voulu, et à la récolte ils sont trop vieux pour être exportés. Des travaux réalisés en Guadeloupe ont permis de montrer qu'il existe une relation très robuste entre la DVV et l'âge physiologique des fruits. L'âge physiologique se définit comme la somme des températures cumulées en base 14 (mesurée en degrés.jours (dj)) par le fruit au cours de sa croissance (Ganry, 1978). Généralement, on considère que les fruits doivent être récoltés à 900 dj pour que la DVV soit supérieure au transit time (Jullien, 2000), et ce stade peut être modulé en fonction de la vitesse des flux de fruits entre la récolte et la mûrisserie.

### 7.2.2- Effets de la MRN sur la qualité des bananes

Les cercosporioses sont connus depuis longtemps comme des stress qui provoquent la réduction de la DVV (Stover 1974). Des études récentes ont montré que cet effet est direct et non lié à un effet trophique de la réduction de la surface foliaire. En effet, les cercosporioses sont les seuls stress de culture qui modifient la relation très robuste entre l'âge physiologique et la DVV et il est clairement établi que c'est la présence régulière du champignon sur le bananier qui provoque le raccourcissement de la DVV (Chillet *et al.*, 2009; Castelan *et al.*, 2013). Le mécanisme de cet effet reste mal connu mais on fait l'hypothèse que des métabolites secondaires produit par *M. fijiensis* à partir des feuilles malades seraient à l'origine du murissement précoce des fruits (Castelan *et al.*, 2013).



**Fig. 15.** Impact de la maladie des raies noires sur la production de la banane dessert destinée à l'exportation

## **8- La lutte contre la MRN dans la filière banane export**

### *8.1- Les stratégies de lutte chimique*

La filière banane export exploite exclusivement les variétés du sous-groupe Cavendish très sensibles à la MRN. Dans cette situation, la lutte chimique demeure le moyen le plus efficace et est incontournable pour le contrôle de la maladie. Les fongicides sont appliqués sur de larges surfaces au moyen de pulvérisations aériennes à l'aide d'avions équipés de buses (Fig. 16). Dans la majorité des pays producteurs, la lutte chimique consiste à l'emploi de fongicides de contact appliqués à des fréquences élevées dans le cadre de stratégies de traitements systématiques. Cependant dans quelques pays des approches de lutte raisonnée avec des fongicides systémiques dans des stratégies d'avertissement ont été employées avec succès (Marin *et al.*, 2003; de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2010).

#### *8.1.1- La stratégie d'avertissement*

Cette stratégie repose d'abord sur le déclenchement des traitements en fonction de seuils d'intervention définis à partir de l'observation précoce des nouvelles infections à travers l'estimation d'un descripteur biologique appelé l'état d'évolution de la maladie (EE) (Ganry, 1978). Un autre élément clé de cette stratégie repose sur l'utilisation de fongicides systémiques à fort effet curatif. Ils sont employés dans l'huile minérale, celle-ci ayant un effet fongistatique, ce qui permet de renforcer l'efficacité du traitement. Des fongicides ayant des modes d'action différents sont appliqués en alternance afin de limiter les risques de résistance. Cette stratégie permet de limiter le nombre de traitements annuels à 12-14 applications et elle a été employée avec succès dans les Antilles Françaises et au Cameroun. Mais l'utilisation intensive de fongicides systémiques a entraîné le développement de la résistance chez *M. fijiensis* (Marin *et al.*, 2003; de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2010).

#### *8.1.2- La stratégie de traitements systématiques*

Cette stratégie est basée sur la mise en œuvre d'un programme de traitements annuels préétabli. Les fongicides de contact sont alors appliqués à un rythme hebdomadaire, soit 50 à 60 applications annuelles. Dans tous les pays, l'application de cette stratégie ou le changement de stratégies (abandon de l'avertissement) s'est accompagné d'une augmentation des coûts de production mais également des nuisances environnementales. Dans la stratégie de traitement systématique 30-40 kg de matière active/ha/an sont appliquées contre 2-4 kg/ha/an dans la stratégie d'avertissement (de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2010).

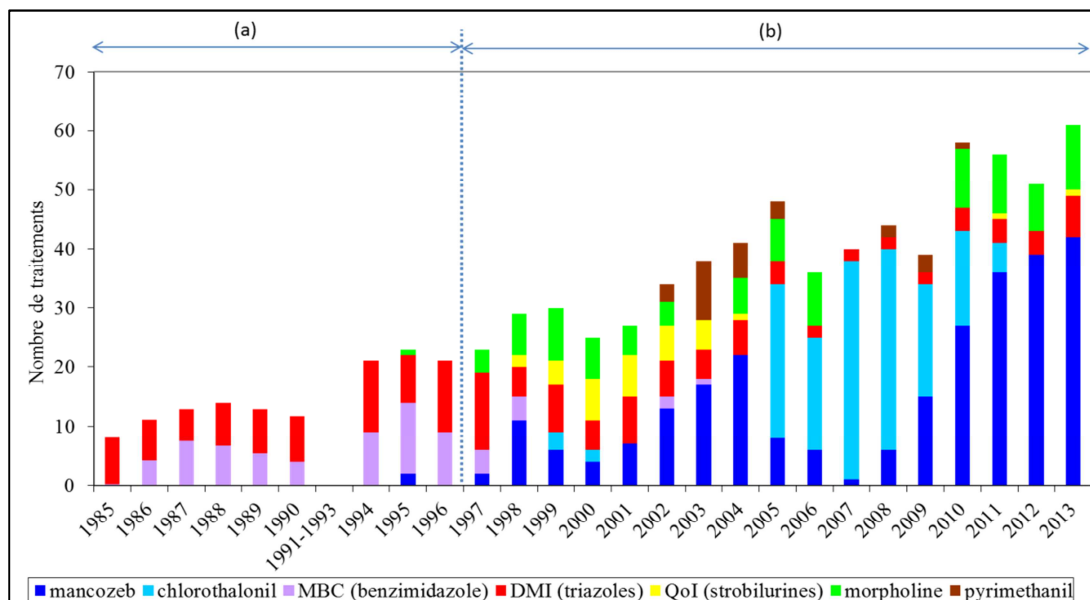
### *8.2- Les conséquences de la résistance aux fongicides au Cameroun (site d'étude)*

Dans les plantations commerciales de bananes dessert au Cameroun, les deux stratégies de lutte se sont succédées pour le contrôle de cette maladie et ont profondément influencé l'évolution de la résistance (Fig. 17). Tout d'abord à la fin des années 80 la stratégie d'avertissement avait permis de contrôler avec succès la maladie. Cette stratégie reposait sur l'emploi de deux groupes de fongicides systémiques à fort

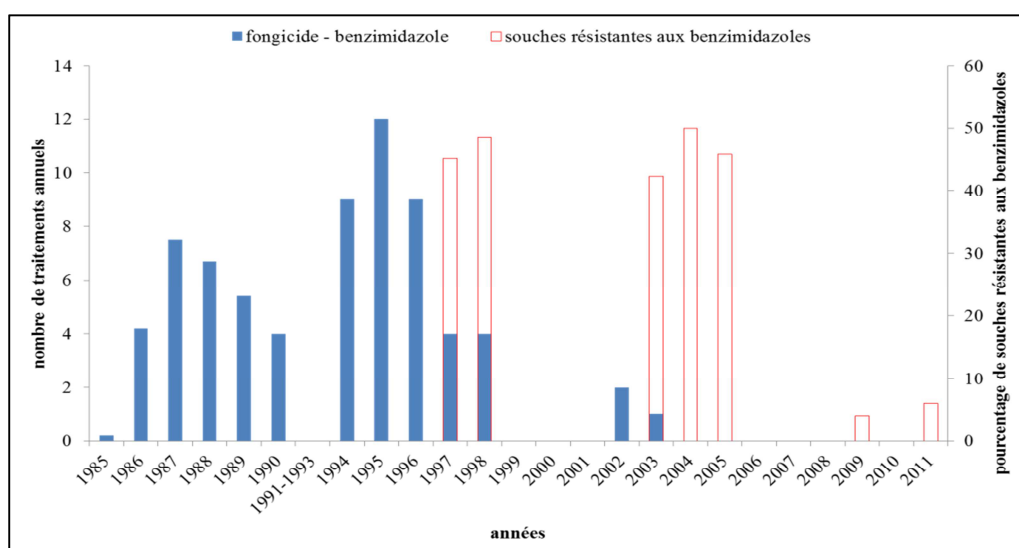
effet curatif et utilisés en alternance : les MBC, les DMI. Cette stratégie de lutte raisonnée limitait le nombre de traitements à 12-14 par an. A la suite des problèmes de logistique d'équipements de traitements, il y a eu une période sans traitements ce qui a provoqué des niveaux de maladie très élevés. En réponse, il y a eu une augmentation du nombre de traitements et ce qui a provoqué un développement rapide de la résistance dès 1996. Plusieurs nouveaux autres fongicides tels que les morpholines et mancozèbe ont alors été introduits. En 1999, les QoI ont été introduits et ont développé la résistance après seulement 2 à 3 ans d'utilisation. Avec l'augmentation du nombre de traitements, on a alors basculé progressivement vers des stratégies de traitements systématiques avec une part de plus en plus importante des fongicides de contact. Depuis 2005, ils sont employés de manière accrue et constituent plus de 80 % de fongicides appliqués (Fig. 17). Mais cette stratégie a également engendré des problèmes environnementaux importants. Depuis cette date, les MBC et les QoI ne sont plus employés et certains DMI continuent d'être employés. Ce retrait prolongé s'est traduit par une diminution de la résistance notamment aux MBC (Fig. 18). Cette évolution pourrait s'expliquer par l'interaction de la sélection et de la migration. En effet, d'une part en absence de fongicide il y aurait un effet de la sélection contre les souches résistantes (s'il y a un coût de la résistance). D'autre part l'environnement des plantations commerciales est compartimenté avec des grands blocs des zones traitées (ZT) de bananes desserts entourées de zones non traitées (ZNT) composées d'une multitude de plantains cultivés de manières extensives ce qui favorise les flux de gènes entre les deux compartiments.



**Fig. 16.** Traitement fongicide par application aérienne dans une parcelle commerciale de banane dessert



**Fig. 17.** Evolution du nombre de traitements en fonction de différents types de fongicides dans le cadre de différentes stratégies de lutte contre la maladie des raies noires dans une plantation commerciale au Cameroun. (a) période d'application de la stratégie raisonnée d'avertissement basée sur l'application des traitements en fonction du niveau de développement de la maladie, l'emploi de fongicides systémiques employé en alternance (fort effet curatif et risque de résistance élevé ou modéré), la limitation des impact environnementaux 2-3kg de matière active /ha/an. (b) période d'application de la stratégie de traitements systématiques reposant sur traitements hebdomadaires, 80-90% de fongicide de contact (préventifs, pas de risque de résistance), augmentation des impacts environnementaux 30-40kg de m.a/ha/an.



**Fig. 18.** Un exemple de l'évolution de la résistance aux benzimidazoles chez *M. fijiensis* en fonction du nombre de traitements dans deux plantations commerciales au Cameroun.

## 9- Objectifs de la thèse

Dans le cadre de cette thèse, je m'intéresse à l'étude de l'évolution de la résistance aux fongicides chez *M. fijiensis* agent causal de la MRN dans le contexte de production au Cameroun. Dans les mécanismes impliqués dans cette évolution il y a d'une part la migration qui joue un rôle important dans les échanges de spores entre les ZT et les ZNT, d'autre part il y a la sélection par les fongicides dans les ZT et éventuellement la contre sélection liée au coût de la résistance en l'absence de fongicide. Le rôle de la migration sur l'évolution de la résistance a déjà été étudié dans le cadre de la thèse d'A. Rieux (Rieux *et al.* 2011, 2012, 2013 et 2014). L'objectif de la présente thèse est de comprendre le rôle de la sélection et de son interaction avec les flux de gènes sur l'évolution de la résistance aux fongicides. Deux questions principales se dégagent de cet objectif : comment quantifier la sélection ou la contre sélection dans le cas de la résistance aux fongicides ? Comment intégrer les paramètres de sélection et de migration pour tester un scénario pratique de gestion de la résistance ?

Pour apporter des réponses à ces questions nous avons mesuré au champ un coefficient de sélection en suivant l'évolution de la résistance et dans des conditions où la sélection est la seule force. Dans un premier temps nous avons d'abord amélioré la méthode biologique de détection pour mesurer la résistance de manière plus précise (chapitre 1). Dans un second temps nous avons mesuré au champ des niveaux de résistance afin d'estimer un coefficient de sélection et de contre sélection pour la résistance à deux fongicides systémiques : les QoI pour la résistance qualitative et une évolution rapide de la résistance et les DMI pour la résistance quantitative et une évolution graduelle de la résistance (chapitre 2). Et enfin nous avons commencé à explorer l'effet de l'interaction sélection flux de gènes en testant une stratégie d'éradication de souches résistantes par l'introduction massive de migrants sensibles dans une parcelle commerciale (chapitre 3).

## Référence bibliographiques

- Al-Mughrabi, K.I., Gray, A.B., 1995. Competition between triadimefon-sensitive and triadimefon-resistant isolates of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Disease* 79, 709-712.
- Albertini, C., Gredt, M., Leroux, P., 1999. Mutations of the  $\beta$ -Tubulin Gene Associated with Different Phenotypes of Benzimidazole Resistance in the Cereal Eyespot Fungi *Tapesia yallundae* and *Tapesia acuformis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 64, 17-31.
- Amil, A.F., Heaney, S.P., Stanger, C., Shaw, M.W., 2007. Dynamics of QoI sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis* in Costa Rica during 2000 to 2003. *Phytopathology* 97, 1451-1457.
- Anderson, J.B., 2005. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews Microbiology* 3, 547-556.
- Aqeel, A., Pasche, J., Gudmestad, N., 2008. Variability in morphology and aggressiveness among North American vegetative compatibility groups of *Colletotrichum coccodes*. *Phytopathology* 98, 901-909.

- Avila-Adame, C., Köller, W., 2003. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Current Genetics* 42, 332-338.
- Baraldi, E., Mari, M., Chierici, E., Pondrelli, M., Bertolini, P., Pratella, G., 2003. Studies on thiabendazole resistance of *Penicillium expansum* of pears: pathogenic fitness and genetic characterization. *Plant Pathology* 52, 362-370.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, 2002. Strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58, 649-662.
- Barton, N.H., Briggs, D.E.G., Eisen, J.A., Golstein, D.B., Patel, N.H., 2007. Evolution. Inglis, J., New York.
- Brasseur, G., Saribaş, A.S., Daldal, F., 1996. A compilation of mutations located in the *cytochrome b* subunit of the bacterial and mitochondrial *bc sub* complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1275, 61-69.
- Brent, K.J., 1995. Fungicide Resistance in Crop Pathogens, How Can it be Managed. Global Crop Protection Federation, Brussels.
- Brent, K.J., Hollomon, W, D., 1998. Fungicide resistance: the assessment of risk. Global Crop Protection Federation Brussels, Belgium.
- Broodie III, E.D., Moore, A.J., Jansen, F.J., 1995. Visualising and quantifying natural selection. *Tree* 10, 313-318.
- Brun, J., 1963. La cercosporiose du bananier en Guinée. Etude de la phase ascosporee du *Mycosphaerella musicola* Leach. Université de Paris, Paris.
- Cañas-Gutiérrez, G.P., Angarita-Velásquez, M.J., Restrepo-Flórez, J.M., Rodríguez, P., Moreno, C.X., Arango, R., 2009. Analysis of the *CYP51* gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science* 65, 892-899.
- Carlier, J., Lebrun, M.H., Zapater, M.F., Dubois, C., Mourichon, X., 1996. Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular ecology* 5, 499-510.
- Carlier, J., Mourichon, X., Jones, D.R. (Eds.), 2000. Black leaf streak: the causal agent. CABI Publishing, New York.
- Castelan, F., Abadie, C., Hubert, O., Chilin-Charles, Y., De Lapeyre de Bellaire, L., Chillet, M., 2013. Relation between the severity of Sigatoka disease and banana quality characterized by pomological traits and fruit green life. *Crop Protection* 50, 61-65.
- Champion, J., 1963. Le bananier. Paris.
- Chau, A.S., Mendrick, C.A., Sabatelli, F.J., Loebenberg, D., McNicholas, P.M., 2004. Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to azoles. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 2124-2131.
- Chen, X., Steed, A., Travella, S., Keller, B., Nicholson, P., 2009. *Fusarium graminearum* exploits ethylene signalling to colonize dicotyledonous and monocotyledonous plants. *New Phytologist* 182, 975-983.
- Chillet, M., Abadie, C., Hubert, O., Chilin-Charles, Y., De Lapeyre de Bellaire, L., 2009. Sigatoka disease reduces the greenlife of bananas. *Crop Protection* 28, 41-45.

- Chillet, M., de Lapeyre de Bellaire, L., 1996. Elaboration de la qualité des bananes au champ. Détermination de critères de mesure. *Fruits* 51, 317-326.
- Chin, K., Chavaillaz, D., Kaesbohrer, M., Staub, T., Felsenstein, F., 2001. Characterizing resistance risk of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* strobilurins. *Crop Protection* 20, 87-96.
- Churchill, A.C., 2011. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular plant pathology* 12, 307-328.
- Cools, H., Parker, J., Kelly, D., Lucas, J., Fraaije, B., Kelly, S., 2010. Heterologous expression of mutated eburicol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) proteins of *Mycosphaerella graminicola* to assess effects on azole fungicide sensitivity and intrinsic protein function. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2866-2872.
- Cools, H.J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J.A., Fraaije, B.A., 2012. Overexpression of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Management Science* 68, 1034-1040.
- Cools, H.J., Mullins, J.G., Fraaije, B.A., Parker, J.E., Kelly, D.E., Lucas, J.A., Kelly, S.L., 2011. Impact of recently emerged sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) variants of *Mycosphaerella graminicola* on azole fungicide sensitivity. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 3830-3837.
- Corio-Costet, M.-F., Dufour, M.-C., Cigna, J., Abadie, P., Chen, W.-J., 2011. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 129, 315-329.
- de Lapeyre de Bellaire, L., Foure, E., Abadie, C., Carlier, J., 2010. Black Leaf Streak Disease is challenging the banana industry. *Fruits* 65, 327-342.
- Deighton, F.C., 1976. Studies on *Cercospora* and allied genera. VI. *Pseudocercospora* Speg., *Pantospora* Cif. and *Cercoseptoria*. *Petr. Mycol. Pap* 140, 1-168.
- Delye, C., Bousset, L., Corio-Costet, M.-F., 1998. PCR cloning and detection of point mutations in the eburicol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) gene from *Erysiphe graminis* f. sp. *bordei*, a “recalcitrant” fungus. *Current Genetics* 34, 399-403.
- Ennos, R., McConnell, K., 1995. Using genetic markers to investigate natural selection in fungal populations. *Canadian Journal of Botany* 73, 302-310.
- Fouré, E., 1984. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet et de quelques caractéristiques biologiques de la maladie au Gabon. *Fruits* 39, 365-378.
- Fouré, E., 1988. Stratégies de lutte contre la cercosporiose noire des bananiers et plantains provoquée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. L'avertissement biologique au Cameroun. Evaluation des possibilités d'évaluation. *Fruits* 43, 269-274.
- Fouré, E., Moreau, A., 1992. Contribution à l'étude épidémiologique de la cercosporiose noire dans la zone de Moungo au Cameroun de 1987 à 1989. *Fruits* 47, 3-16.
- Ganry, J., 1978. Recherche d'une méthode d'estimation de la date de récolte du bananier à partir de données climatiques dans les conditions des Antilles. *Fruits*.



- Gauhl, F., 1994. Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain and banana (*Musa* spp.) in Costa Rica, Central America. Montpellier: INIBAP.
- Geier, B.M., SchaK gger, H., Brandt, U., Colson, A.M., von Jagow, G., 1992. Point mutation in cytochrome b of yeast ubihydroquinone: cytochrome-c oxidoreductase causing myxothiazol resistance and facilitated dissociation of the iron-sulfur subunit. *Eur. J. Biochem.* 208, 375-380.
- Genet, J.L., Jaworska, G., Deparis, F., 2006. Effect of dose rate and mixtures of fungicides on selection for QoI resistance in populations of *Plasmopara viticola*. *Pest Management Science* 62, 188-194.
- Georgopoulos, S., Skylakakis, G., 1986. Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance. *Crop Protection* 5, 299-305.
- Gisi, U., 2014. Assessment of selection and resistance risk for demethylation inhibitor fungicides in *Aspergillus fumigatus* in agriculture and medicine: a critical review. *Pest Management Science* 70, 352-364.
- Gisi, U., Chin, K., Knapova, G., Küng Färber, R., Mohr, U., Parisi, S., Sierotzki, H., Steinfeld, U., 2000. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Protection* 19, 863-872.
- Hall, R.J., Gubbins, S., Gilligan, C.A., 2004. Invasion of drug and pesticide resistance is determined by a trade-off between treatment efficacy and relative fitness. *Bulletin of Mathematical Biology* 66, 825-840.
- Hamada, M.S., Yin, Y., Chen, H., Ma, Z., 2011. The escalating threat of *Rhizoctonia cerealis*, the causal agent of sharp eyespot in wheat. *Pest Management Science* 67, 1411-1419.
- Helmerhorst, E.J., Reijnders, I.M., van't Hof, W., Simoons-Smit, I., Veerman, E.C., Amerongen, A.V.N., 1999. Amphotericin B-and Fluconazole-Resistant *Candida* spp., *Aspergillus fumigatus*, and other newly emerging pathogenic fungi are susceptible to basic antifungal peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 702-704.
- Henderson, J., Pattemore, J., Porchun, S., Hayden, H., Van Brunschot, S., Grice, K., Peterson, R., Thomas-Hall, S., Aitken, E., 2006. Black Sigatoka disease: new technologies to strengthen eradication strategies in Australia. *Australasian Plant Pathology* 35, 181-193.
- Holmes, G., Eckert, J., 1995. Relative fitness of imazalil-resistant and-sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Disease* 79, 1068-1073.
- Hsiang, T., Yang, L., Barton, W., 1998. Relative virulence of isolates of *Sclerotinia homoeocarpa* with varying sensitivity to propiconazole. *European Journal of Plant Pathology* 104, 163-169.
- Jones, D.R., 2000. Diseases of Banana, *Abaca* and *Enset*, Wallingford, UK.
- Jullien, A., 2000. Croissance, développement et qualité des fruits du bananier (*Musa* spp groupe AAA cv Grande Naine). Modélisation de la répartition des assimilats entre les fruits du régime. Institut National Agronomique de Paris-Grignon, Paris, p. 92 p.
- Karamura, E., Karamura, D., 1995. Banana morphology—part II: the aerial shoot. Bananas and plantains. Springer, pp. 190-205.
- Karaoglanidis, G., Thanassoulopoulos, C., 2003. Cross-resistance patterns among sterol biosynthesis inhibiting fungicides (SBIs) in *Cercospora beticola*. *European Journal of Plant Pathology* 109, 929-934.

- Karaoglanidis, G., Thanassouloupoulos, C., Ioannidis, P., 2001. Fitness of *Cercospora beticola* field isolates—resistant and—sensitive to demethylation inhibitor fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 107, 337-347.
- Karaoglanidis, G.S., Markoglou, A.N., Bardas, G.A., Doukas, E.G., Konstantinou, S., Kalampokis, J.F., 2011. Sensitivity of *Penicillium expansum* field isolates to tebuconazole, iprodione, fludioxonil and cyprodinil and characterization of fitness parameters and patulin production. *International journal of food microbiology* 145, 195-204.
- Kinay, P., Mansour, M.F., Mlikota Gabler, F., Margosan, D.A., Smilanick, J.L., 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection* 26, 647-656.
- Kingsolver, J.G., Pfennig, D.W., 2007. Patterns and power of phenotypic selection in nature. *Bioscience* 57, 561-572.
- Koenraadt, H., Somerville, S.C., Jones, A., 1992. Characterization of mutations in the beta-tubulin gene of benomyl-resistant field strains of *Venturia inaequalis* and other plant pathogenic fungi. *Phytopathology* 82, 1348-1354.
- Köller, W., Wilcox, W., Barnard, J., Jones, A., Braun, P., 1997. Detection and quantification of resistance of *Venturia inaequalis* populations to sterol demethylation inhibitors. *Phytopathology* 87, 184-190.
- Lenormand, T.a.R., M., 1998. Resistance management: the stable zone strategy. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265, 1985-1990.
- Leonard, K., 1977. Selection pressures and plant pathogens. *Annals of the New York Academy of Sciences* 287, 207-222.
- Lepoivre, P., 2003. *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. De Boeck Supérieur.
- Leroux, P., 2003. Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Comptes Rendus Biologies* 326, 9-21.
- Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., Walker, A.S., 2007. Mutations in the *CYP51* gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 $\alpha$  demethylation inhibitors in the field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 63, 688-698.
- Leroux, P., Gardan, L. (Eds.), 2003. *La lutte chimique en phytopathologie*. De Boeck et Larcier, Bruxelles.
- Leroux, P., Walker, A.-S., 2010. Les fongicides affectant les processus respiratoires Épisode 1-Modes d'action et phénomènes de résistance chez les anciennes substances (multisites et unisites affectant la biodisponibilité de l'ATP) et les nouvelles de type SDHI. *Phytoma-La Défense des Végétaux*, 8-11.
- Luo, C.-X., Cox, K.D., Amiri, A., Schnabel, G., 2008. Occurrence and detection of the DMI resistance-associated genetic element 'Mona' in *Monilinia fructicola*. *Plant Disease* 92, 1099-1103.
- Ma, Z., Michailides, T.J., 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24, 853-863.

- Ma, Z., Yoshimura, M.A., Michailides, T.J., 2003. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7145-7152.
- Malandrakis, A.A., Markoglou, A.N., Konstantinou, S., Doukas, E.G., Kalampokis, J.F., Karaoglanidis, G.S., 2013. Molecular characterization, fitness and mycotoxin production of benzimidazole-resistant isolates of *Penicillium expansum*. *International journal of food microbiology* 162, 237-244.
- Malandrakis, A.A., Markoglou, A.N., Nikou, D.C., Vontas, J.G., Ziogas, B.N., 2006. Biological and molecular characterization of laboratory mutants of *Cercospora beticola* resistant to Qo inhibitors. *European Journal of Plant Pathology* 116, 155-166.
- Marin, D.H., Romero, R.A., Guzman, M., Sutton, B.C., 2003. Black Sigatoka : an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease* 87, 208-222.
- Markoglou, A.N., Malandrakis, A.A., Vitoratos, A.G., Ziogas, B.N., 2006. Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 115, 149-162.
- Mc Donald, B.A., Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40, 349-379.
- McGee, D., Zuck, M., 1981. Competition between benomyl-resistant and sensitive strains of *Venturia inaequalis* on apple seedlings [Fungicide tolerance]. Science Monograph University of Wyoming, Agricultural Experiment Station.
- Meredith, D.S.a.L., J. S., 1969. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52, 459-476.
- Milgroom, M.G., Levin, S.A., Fry, W.E., 1989. Population genetics theory and fungicide resistance. *Plant disease epidemiology* 2, 340-367.
- Mobambo, K., Gauhl, F., Pasberg-Gauhl, C., Zuofa, K., 1996. Season and plant age effect evaluation of plantain for response to black sigatoka disease. *Crop Protection* 15, 609-614.
- Moretti, M., Arnoldi, A., D'Agostina, A., Farina, G., Gozzo, F., 2003. Characterization of field-isolates and derived DMI-resistant strains of *Cercospora beticola*. *Mycol. Res.* 107, 1178–1188.
- Mouliom-Pefoura, A., Foko, J. and Lassoudière, A., 1999. Spatial and temporal developement of the Sigatoka diseases on banana and plantain in Cameroon. *African Crop Science Society*, 1007-1019.
- Mullins, J.G., Parker, J.E., Cools, H.J., Togawa, R.C., Lucas, J.A., Fraaije, B.A., Kelly, D.E., Kelly, S.L., 2011. Molecular modelling of the emergence of azole resistance in *Mycosphaerella graminicola*. *PloS one* 6, e20973.
- Ngando, J.E., Rieux, A., Nguidjo, O., Pignolet, L., Dubois, C., Mehl, A., Zapater, M.F., Carlier, J., de Lapeyre de Bellaire, L., 2015. A novel and more reliable bioassay to monitor fungicide sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science* 71, 441-451.
- Pasche, J.S., Gudmestad, N.C., 2008. Prevalence, competitive fitness and impact of the F129L mutation in *Alternaria solani* from the United States. *Crop Protection* 27, 427-435.
- Price, N., 1995. Banana morphology—part I: Roots and rhizomes. Bananas and plantains. Springer, pp. 179-189.

- Rapilly, F., 1991. L'épidémiologie en pathologie végétale : mycoses aériennes. Paris.
- Raposo, R., Delcan, J., Gomez, V. and Melgarejo, P., 1996. Distribution and fitness of isolates of *Botrytis cinerea* with multiple fungicide resistance in Spanish greenhouses. *Plant Pathology* 45, 497-505.
- Rieux, A., Lenormand, T., Carlier, J., Lapeyre de Bellaire, L., Ravigné, V., 2013. Using neutral cline decay to estimate contemporary dispersal: a generic tool and its application to a major crop pathogen. *Ecology letters* 16, 721-730.
- Romero, R.A., and Sutton, T. B., 1998. Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black Sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant Disease* 82, 931-934.
- Roohparvar, R., Taher, M.A., Mohadesi, A., 2008. Simultaneous Determination of Nickel and Copper by H-Point Standard Addition Method First-Order Derivative Spectrophotometry in Plant Samples After Separation and Preconcentration on Modified Natural Clinoptilolite as a New Sorbent. *Journal of AOAC International* 91, 637-645.
- Scheinflug, H., 1987. Fungal resistance to setrol biosynthesis inhibitors: a new challenge. *Plant Disease* 71, 1066-1074.
- Schüepp, H., Küng, M., 1981. Stability of tolerance to MBC in populations of *Botrytis cinerea* in vineyards of northern and eastern Switzerland. *Canadian Journal of Plant Pathology* 3, 180-181.
- Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., Gisi, U., 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science* 56, 833-841.
- Skutch, A.F., 1932. Anatomy of the axis of the banana. *Botanical Gazette*, 233-258.
- Stover, R., 1980. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant disease* 64, 750-755.
- Stover, R.H., 1974. Effect of measured levels of Sigatoka disease of bananas on fruit quality and leaf senescence. *Tropical agriculture* 51, 531-542.
- Stover, R.H., Simmonds, N.W., 1987. Bananas. Essex.
- Swennen, R., Vuylsteke, D., 1987. Morphological taxonomy of plantains (*Musa* cultivars AAB) in West Africa. *Banana and plantain breeding strategies*, 165-171.
- Tomekpe, K. (Ed), 1996. Taxonomie et évolution des bananiers. INIBAP Paris
- Trumpower, B.L., Gennis, R.B., 1994. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annual review of biochemistry* 63, 675-716.
- Ziogas, B.N., Baldwin, B. C. and Young, J. E., 1997. Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA 5504) in *Septoria tritici*. *Pesticide sciences* 50, 28-34.
- Zou, G., Ying, S.H., Shen, Z.C., Feng, M.G., 2006. Multi-sited mutations of beta-tubulin are involved in benzimidazole resistance and thermotolerance of fungal biocontrol agent *Beauveria bassiana*. *Environmental microbiology* 8, 2096-2105.

zur Wiesch, P.A., Kouyos, R., Engelstädter, J., Regoes, R.R., Bonhoeffer, S., 2011. Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases. *The Lancet infectious diseases* 11, 236-247.

## **II- CHAPITRE 1 : Amélioration des méthodes biologiques de mesure de la résistance aux fongicides**

### **Présentation générale**

Ce premier chapitre est présenté par un article publié dans la revue *Pest Management Science* (Vol 71, pages 441-451) et qui propose une nouvelle méthode, la méthode conidie comme une alternative pour effectuer les mesures de la résistance aux fongicides chez *M. fijiensis*.

L'estimation d'un coefficient de sélection repose sur le suivi de la fréquence de la résistance au cours du temps dans les dispositifs expérimentaux. Ce suivi nécessite l'emploi d'outils précis pour effectuer les mesures. Dans la zone d'étude au Cameroun, les outils moléculaires adaptés ne sont pas disponibles sur place dans le laboratoire du Carbap, or il était important d'analyser rapidement la résistance non seulement pour estimer un coefficient de sélection mais également pour mieux piloter l'expérimentation au cours de sa mise en œuvre. La méthode biologique classique basée sur les tests de germination d'ascospores est très imprécise. Nous avons alors développé la méthode conidie basée sur des tests de germination de conidies récolées à partir de jeunes lésions (stade 2-3) comme une alternative. La méthode conidie permet notamment de réaliser des tests en temps voulu indépendamment de la saison, de respecter un plan d'échantillonnage, d'éviter des confusions d'espèces du genre *Mycosphaerella* et de comparer des populations sur milieu de culture en présence et en absence de fongicide.

**Article 1 : A novel bioassay to monitor fungicide sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis***

Josué E Ngando,<sup>a</sup> Adrien Rieux,<sup>b</sup> Oscar Nguidjo,<sup>a</sup> Luc Pignolet,<sup>b</sup> Cécile Dubois,<sup>c</sup> Andreas Mehl,<sup>d</sup> Marie-Françoise Zapater,<sup>b</sup> Jean Carlier,<sup>b</sup> and Luc de Lapeyre de Bellaire.<sup>e</sup>

**Keywords:** *Mycosphaerella fijiensis*, monitoring, fungicide resistance, mutation, phenotype, conidia.

<sup>a</sup> African Research Centre on Banana and Plantain (CARBAP), 11 Dinde street – 832 Douala, Cameroon.

<sup>b</sup> CIRAD, UMR BGPI, TA A-54 / K Campus international de Baillarguet – 34398 Montpellier, France.

<sup>c</sup> CIRAD - UMR AGAP – APMV Research Team, TA A-108/03 - Av. Agropolis - 34398 Montpellier Cedex 5 – France.

<sup>d</sup> Bayer CropScience, AG Alfred-Nobel-Str. 50, Building 6240 D-40789 Monheim, Germany.

<sup>e</sup> CIRAD, PERSYST, UPR Banana, Plantain and Pineapple Cropping Systems, TA B-26/PS4 (Bur. 108), Boulevard de la Lironde, 34398 Montpellier Cedex 5; Tel : (33) 4 67 61 58 28 ; Fax. : (33) 4 67 61 56 88 ; e-mail : [luc.de\\_lapeyre@cirad.fr](mailto:luc.de_lapeyre@cirad.fr)

## ABSTRACT

**BACKGROUND :** Black Leaf Streak Disease (BLSD) is the most important disease of bananas for export. The successful control of BLSD require an intensive use of systemic fungicides, leading to the build-up of resistance and failure of control. Early detection of fungicide resistance is crucial to drive rational chemical strategies. Present methods relying on ascospores germination bio-assays have several drawbacks that could be overcome using conidia.

**RESULTS:** Generally a single genotype is present on the conidial population derived from one lesion. Conidial germination tests with thiabendazole (5 mg litre<sup>-1</sup>) enable a clear detection of strains resistant to MBCs. Germination bio-assays on azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>) enable the detection of most QoI resistant strains, but their proportion might be underestimated with cut-off limits of germ tube length ( $L > 120 \mu\text{m}$ ) or growth inhibition ( $\text{GI} < 50 \%$ ). The level of fungicide resistance differs at different canopy levels of a banana tree, which should be considered for sampling. The ascospore germination bio-assay provided more variable estimations of the level of resistance as compared to the new conidial germination bio-assay. **CONCLUSION:** Germination bio-assays performed with conidia obtained from young lesions overcome most drawbacks encountered with ascospore germination bio-assays and could be considered as a new reference method for fungicide resistance monitoring in this species. We propose different steps, from sampling to microscopic examinations, for the implementation of this technique.

## 1 INTRODUCTION

The fungus *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black leaf streak disease (BLSD) of bananas, exhibits a high adaptation capacity.<sup>1</sup> The rapid widespread development of fungicide resistant strains has been responsible for major changes in strategies to manage BLSD, which remains the



main constraint to growing bananas for export.<sup>1,2</sup> Commercial banana varieties are highly sensitive to the pathogen and export bananas are managed with intensive chemical control using contact or systemic fungicides, or a combination of both.<sup>1,2</sup> Antimitotic fungicides, classified as methyl benzimidazole carbamates (MBCs), have been used since the early 1970s and *M. fijiensis* strains bearing the  $\beta$ -tubulin E198A gene mutation initially emerged throughout Latin America, Africa and the West Indies 2-10 years thereafter.<sup>1,3,4,5</sup> Demethylation inhibitor (DMI) fungicides were introduced in the mid-1980s and changes in sensitivity were first observed 10 years later.<sup>5,6,7</sup> Nevertheless, DMIs are still applied in most banana growing regions because different compounds of this group are not affected by resistance to the same extent.<sup>7,8</sup> Quinone outside inhibitor (QoI) fungicides were introduced in Latin America between 1997 and 2000, and strains carrying the target site mutation G143A causing strong disruptive resistance appeared after only 2-3 years of their use.<sup>5,9,10,11,12</sup> The development of fungicide resistance questions the efficacy of sustainable forecasting-based disease control systems which strongly rely on highly curative systemic fungicides.<sup>5</sup> Contact pesticides have therefore been used more extensively because resistant strains to these fungicides have not been detected since they have a multisite mode of action. This has led to a substantial increase in quantities of active ingredients applied per-hectare.<sup>2</sup> Since systemic fungicides exert a strong selection pressure on fungal populations, variations in pathogen fungicide resistance must be closely monitored using reliable assessment methods, so as to be able to tailor more sustainable systemic fungicide treatment strategies.

The method routinely used for monitoring of resistance in *M. fijiensis*, and recognized by the Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), is based on ascospores germination tests. This involves mixing composite samples of leaf necrotic mass-infected tissue producing ascospores, and then incubating the samples to induce ascospores projection directly on fungicide-supplemented and control (no fungicide) medium (Jacome LH ([www.frac.info/Monitoring\\_Methods](http://www.frac.info/Monitoring_Methods))). However, this method has some drawbacks: (i) the extent of ascospores production is often deficient, so the tests often fail. Leaf necrosis is also hard to sample in commercial banana plantations because lesions are

systematically removed for prophylactic reasons; (ii) there is always a high discrepancy between the analysed ascospores population and the initial sample. Effectively, ascospore production is generally very scarce, and from the initial 25 leaves collected in the field, only some few leaves will produce ascospores in some rare lesions, so, the final analysed population is not representative of the initial sampling plan; (iii) there is a high risk of confusing *M. fijiensis* ascospores with those of other *Mycosphaerella* species. Indeed, over 20 species of this genus have actually been identified on necrotic banana leaves,<sup>13</sup> and ascospores of these species are very hard to differentiate, especially in the presence of fungicides; finally (iv) in more precise bioassays, single or specific strains are compared in the presence and absence of fungicide, whereas this is not possible with the ascospore method, because the fungicide sensitivity of different ascospores populations is compared between untreated control and fungicide-supplemented medium.

In *M. musicola*, the causal agent of another leaf spot disease of banana, conidia production is abundant and conidial germination tests have been developed for monitoring of fungicide resistance in this species.<sup>14,15,16</sup> Conidia production is not as abundant in *M. fijiensis*, but conidia can be harvested by placing lesions over an agar medium.<sup>17</sup>

We have hypothesized that conidia could be used for germination inhibition tests in *M. fijiensis* to help solving certain problems that may arise when using ascospores. Indeed, the use of conidia allows: (i) to carry out germination tests in any situation since conidial sporulation is especially early in this species and therefore always present, even in treated areas;<sup>18,19</sup> (ii) to comply with a sampling plan because of the sporulation regularity; (iii) to avoid confusion between different species as only conidia of *M. fijiensis* are present on stage 2 and stage 3 lesions, and due to their specific morphological features;<sup>13</sup> and (iv) to compare the same population of strains on untreated and fungicide-supplemented media.

Thus, the aim of this study was the development of a new biological test based on conidial germination to be used for routine analysis of fungicide resistance in *M. fijiensis*. First, the validity of this method is based on the assumption that all conidia from the same lesion belong to the same

genotype.<sup>16</sup> We tested this hypothesis by analysing genetic diversity between conidia derived from the same lesion. Moreover, the germination tests are based on the hypothesis that resistant strains can be detected through germination phenotypes when a fungicide is present. However, a range of phenotypes may be observed in the presence of a fungicide and it is sometimes hard to associate them with the presence of mutations conferring a specific level of resistance. In this fungus, we thus compared the results of germination tests with the molecular detection of mutations that confer resistance to MBC or QoI fungicides.<sup>9,20</sup>

We also tried to optimize different steps for implementing this method. First, one of the advantages of using conidia is that the same lesion can be compared with respect to their response to a range of different fungicides. We therefore tested whether successive application of one lesion over several media containing different fungicides would affect conidial germination due to potential fungicide contamination between media. Moreover, we studied whether certain factors could have an effect on the sampling plan. As apical leaf emission continues until flowering in banana,<sup>21</sup> we hypothesised that several successive cohort populations could be spatially structured at different banana leaf levels in the canopy. We checked this hypothesis by comparing the level of fungicide resistance at different leaf levels. Finally, apart from the various benefits associated with the use of conidia, we also checked whether this new method could enhance reliability as compared to the ascospore-based reference method.

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Isolate collection**

Isolates were collected from different commercial banana plantations in Cameroon where there was a high likelihood of isolating strains resistant to various fungicides. Monospores were collected from resistant isolates able to germinate in the presence of fungicides, as well as highly sensitive strains. Mycelial fragments of colonies formed by each isolate were then frozen (- 80 °C) in glycerol (150 ml litre<sup>-1</sup>)

## 2.2 Fungicides

The fungicides used consisted of technical grade from the following active ingredients: azoxystrobin, propiconazole (Syngenta, Switzerland), thiophanate-methyl (Arysta LifeScience, France) and thiabendazole (Sigma, Switzerland). We also used, SHAM (salicylhydroxamic acid, Alfa Aesar, Germany), an inhibitor of alternative respiration (AoX). Stock solutions of these fungicides were prepared in pure methanol before being added to various media at the desired concentrations. Stock solution of SHAM was prepared in pure dimethyl sulfoxide (DMSO).

## 2.3 Spore germination bioassays

### 2.3.1 Spore germination bio-assay using ascospores from field lesions

Ascospores were analysed using the method recommended by the Fungicide Resistance Action Committee (Jacome LH ([www.frac.info/Monitoring\\_Methods](http://www.frac.info/Monitoring_Methods))).

*Sampling:* for each sample, dry necrotic leaf tissues at stage 6, according to Fouré's scale were collected on 25 banana trees.<sup>22</sup>

*Culturing:* necrotic tissue samples were bulked in a plastic bag, moistened with water-soaked cotton, and incubated for 48 h at 22 °C to enable perithecia maturation. These necrotic tissues were then cut into fragments (2 cm<sup>2</sup>), and five tissue fragments were randomly selected, stapled onto a filter paper disc (90 mm dia.), soaked in water for 10 min to induce ascospore discharge, and then placed in the bottom of a petri dish. Ascospores were left to discharge for 1-2 h on solid medium (agar 20 g litre<sup>-1</sup>) supplemented or not with fungicide, and incubated at 25 °C for 48 h. For each sample 30 fragments, placed in six petri dishes, were monitored for each analysed medium.

### 2.3.2 Spore germination bioassay using conidia from field lesions

*Sampling:* for each sample, pieces of fresh leaf blades bearing young lesions (stages 2-3 on Fouré's scale<sup>22</sup>) were collected on 25 banana trees.

*Culturing*: individual lesions were removed and their underside was applied on the different solid media (agar 20 g litre<sup>-1</sup>) for conidia harvesting. First, two highly sporulating lesions per sampled piece of leaf blade were selected under a stereo-microscope by checking for the presence of conidia on agar medium. Undersides of selected lesions were then applied on the media used for the different tests. The media were then incubated in a culture room at 25 °C for 48 h.

#### 2.3.3 Spore germination bioassay using conidia from pure *M. fijiensis* cultures

Isolates of the collection maintained at - 80 °C were first cultured on V8 300 solid medium containing V8 juice (300 ml), CaCO<sub>3</sub> (3 g), agar (20 g litre<sup>-1</sup>), H<sub>2</sub>O (700 ml) at 25 °C for 10 d. Conidial sporulation was induced in V8 100 solid medium containing V8 juice (100 ml), CaCO<sub>3</sub> (0.2 g), agar (10 g litre<sup>-1</sup>) and H<sub>2</sub>O (900 ml) at pH 6 and 20 °C under continuous fluorescent light for 8-10 d.<sup>23</sup> A conidial suspension was then obtained by stirring a fragment of the colony in sterile distilled water (0.5 ml), and 10 µl of this suspension was deposited on different solid media (agar 20 g litre<sup>-1</sup>), supplemented or not with fungicide. The petri dishes were incubated at 25 °C for 48 h.

#### 2.3.4 Germination assessment

For the ascospores bioassays, germination of a population of 100 ascospores was monitored in the fungicide-free control medium and compared to the germination pattern of another population of 100 individuals monitored in fungicide-supplemented medium. These ascospores populations were randomly selected from sporulating samples derived from 30 fragments cultured for the test. For the conidia bioassays, it was assumed that conidia from the same lesion are genetically identical and representative for the same strain, since they are asexually reproduced. For each test, we analysed conidia from a 50 lesion (strain) sample, as conidia from the same lesion were distributed on the different media.

*MBC fungicides*: in the presence of these fungicides, four germination phenotypes are generally observed: (i) distorted or twisted germ tubes (T), (ii) no germination (NG), (iii) germ tubes with normal growth (N), close to that of the fungicide-free control, and (iv) non-deformed germ tubes

with low growth, i.e. < 100 µm (C). It is known that spores with twisted and deformed germ tubes are sensitive, while those whose germination is comparable to that of the fungicide-free control are resistant. For spores showing growth much lower than in untreated (C) we do not know whether or not these strains carry the E198A mutation, leading usually to complete resistance.<sup>15,24</sup> The percentage of resistance (% R) was calculated as follows: % R = (number of strains whose germination phenotypes corresponded undoubtedly (according to results of experiment 1 in section 2.4) to the presence of the mutation conferring resistance (E198A)/total number of strains) x 100.

*QoI fungicides*: in the presence of this type of fungicide, the spores germinate but the germ tube length is variable. We therefore measured the length (L) of the apical germ tube of each strain and the percentage growth inhibition (GI) was calculated as follows:  $GI_i = 100 - (L_i/L_0 \times 100)$ , where  $L_i$  was the germ tube length on fungicide-supplemented medium of strain i, and  $L_0$  was the germ tube length on fungicide-free control medium. For the ascospores bioassays,  $L_0$  was the mean germ tube growth measured over the entire ascospores population. For the conidia bioassays,  $L_0$  was the value of the i strain on the fungicide-free control medium. In this pathogen, it has been suggested that in the presence of QoI fungicide resistant strains carrying the G143A mutation have an  $L_i$  germ tube that is longer than 150 µm, while the sensitive strains without the mutation are highly inhibited.<sup>1,12</sup> It was also suggested that resistant strains have a GI < 50%. However, the germ tubes and GIs are quite fluctuating, and it is sometimes hard to classify some of these strains on the basis of these criteria. The percentage of resistance (% R) was calculated as follows: % R = (number of strains whose germination phenotypes ( $L_i$  and  $GI_i$  values) correspond undoubtedly (according to results of experiment 1 in section 2.4) to the presence of the G143A mutation conferring resistance/total number of strains) x 100.

## **2.4 Experiment 1: comparison of spore germination bioassays and molecular detection of target mutations conferring resistance to MBCs and QoIs**

For this comparison, we used a collection of 52 strains consisting of a mixture of strains potentially resistant or sensitive to MBCs, and another collection of 60 strains potentially resistant or sensitive to QoIs (Table 1).

#### *2.4.1 Molecular detection of target mutations*

For each strain, we screened for the presence of the G143A mutation conferring resistance to QoIs and for mutation E198A conferring resistance to MBCs in this pathogen.<sup>11,20</sup> For each strain, a new culture was initiated from the collection stored in glycerol at – 80 °C. Mycelium was transferred to V8 300 solid medium for 2 weeks at 25 °C. DNA extraction from growing mycelia was carried out as described by Halkett *et al.*<sup>25</sup>

*PCR amplifications for molecular detection of the mutation conferring resistance to MBCs:* PCR was carried out to amplify a 374 bp portion of the  $\beta$ -tubuline gene containing the codon 198 bearing the E198A mutation. A 20-nucleotides biotin-labelled reverse primer [5'(biotin)GTGCCGAGCTCGTTGACCAG3'] MYCOFI-XX-E198A-F1B and a forward 24-nucleotides primer [5'GCCAGACATGACAGCGGAGACGAG3'] MYCOFI-XX-E198AR1 were used to amplify this region. PCR was performed using a thermal cycler (MJ Research) with a total 35  $\mu$ l mixture containing DNA (2  $\mu$ l), MYCOFI-XX-E198A-F1B (0.7  $\mu$ l at 10  $\mu$ M) and MYCOFI-XX-E198AR1 (0.7  $\mu$ l at 10  $\mu$ M) primers, sterile water (14.1  $\mu$ l) and QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN, Valencia, California, USA) (17.5  $\mu$ l) [containing HotStarTaq DNA Polymerase, KCl (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub> (3  $\mu$ M) and each dNTP (0.2  $\mu$ M)]. The reaction was conducted in the following conditions: 15 min at 95 °C, 30 s at 94 °C, 30 s at 58 °C, 1 min 30 s + 1 s per cycle at 72 °C, 44 cycles of 30 s at 94 °C and a final 10 min extension at 72 °C.

*PCR amplifications for molecular detection of the mutation conferring resistance to QoI:* PCR was used to amplify a 77 bp portion of the cytochrome b gene containing the 143 codon bearing the G143A mutation that confers resistance to QoIs. A 17-nucleotides biotin-labelled reverse primer [5'(biotin)AGGGTATAGCGCTCATT3'] MF02\_rev\_bio and a forward 23-nucleotides primer [5'TGGGTATGTTTTACCTTATGGTC3'] MF01\_for were used to amplify this region. PCR was

conducted using a thermocycler (MJ Research) with a total 42  $\mu$ l mixture containing DNA (2  $\mu$ l), MF01 forward primers (1  $\mu$ l at 10  $\mu$ M) and MF02 reverse primers (1  $\mu$ l at 10  $\mu$ M), sterile water (17  $\mu$ l) and QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (21  $\mu$ l) [containing HotStarTaq DNA Polymerase, KCl(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub> (3  $\mu$ M) and each dNTP (0.2  $\mu$ M)]. The reaction was performed in the following conditions: 15 min at 94 °C, 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, 1 min at 72 °C, 35 cycles of 30 s at 94 °C and a final 10 min extension at 72 °C.

Molecular detection and quantification of the target mutation conferring resistance to QoI and MBCs in PCR products was realized using pyrosequencing technology at Bayer CropScience, Research Disease Control, Monheim, Germany.

#### *2.4.2 Spore germination bioassay*

The 52 and 60 isolates were cultured as described in section 2.3.3. Germination of 52 isolates was monitored in order to detect MBC resistance in the presence of thiophanate-methyl and thiabendazole at rates of 5 and 10 mg litre<sup>-1</sup>, respectively, as indicated in section 2.3.4. For the purpose of detecting QoI resistance in 60 isolates, germination was monitored in the presence of azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>), as indicated in section 2.3.4.

In order to evaluate further the influence of alternative respiration (AoX) on the sensitivity to QoI fungicides, 3 isolates carrying the G143A mutation (resistant) and 3 isolates that did not carry the G143A mutation (sensitive) were sub-sampled. Each strain was grown on different media as indicated in 2.3.4 : T1 = agar + 1 mg.litre<sup>-1</sup> dimethyl sulfoxide (DMSO); T2 = agar + 1 mg.litre<sup>-1</sup> DMSO + 7.66 mg.litre<sup>-1</sup> SHAM; T3 = agar + 1 mg.litre<sup>-1</sup> DMSO + 7.66 mg.litre<sup>-1</sup> SHAM + 10 mg.litre<sup>-1</sup> azoxystrobin, T4 = agar + 10 mg.litre<sup>-1</sup> azoxystrobin. . This experiment was carried out in triplicate. The germ tube growth data were submitted to a one-way ANOVA using the Minitab statistical software package (version 16). The mean germ tube growth were separated with a Tukey test using the same software.



## 2.5 Experiment 2: Analysis of fungal diversity within all the conidia recovered from individual lesions

The aim of this experiment was to determine whether conidia derived from the same lesion were all genetically identical via two approaches: (1) analysis of the entire conidial population within each lesion via germination tests, and (2) molecular marker analysis of the neutral genetic diversity in a sub-sample of this population. Lesions were sampled in a commercial plantation in which the MBC resistance level was around 50%.

### 2.5.1 Homogeneity of resistance to thiophanate-methyl among all conidia recovered from individual lesions

100 lesions showing conidial sporulation were selected. Each lesion was then successively applied 12 times on different sectors within a petri dish containing agar medium (20 g litre<sup>-1</sup>) supplemented with thiophanate-methyl (5 mg litre<sup>-1</sup>), in order to recover all conidia of the lesion. Germination of all conidia of each lesion was monitored as described in section 2.3.4.

### 2.5.2 Genetic diversity among conidia from individual lesions assessed using microsatellite markers

From the 100 lesions used in section 2.5.1, a sub-sample of 33 lesions was randomly selected. For each of these lesions, 6-16 conidia per lesion were isolated (Table 5). Total DNA was extracted from each isolate, as described in section 2.4.1 Among all microsatellite markers described in *M. fijiensis*, we screened eight markers for which high genetic diversity ( $He > 0.4$ ) has been reported in Cameroonian populations.<sup>19</sup> In these conditions, the probability  $p$  that two randomly selected individuals in the population have the same combination of alleles at these eight loci is very low.<sup>26</sup> The selected loci were dinucleotides MfSSR137 ( $He_1 = 0.52$ ) and MfSSR203 ( $He_2 = 0.57$ ), trinucleotides MfSSR322 ( $He_3 = 0.61$ ), MfSSR305 ( $He_4 = 0.47$ ) and MfSSR324 ( $He_5 = 0.44$ ) and tetranucleotides MfSSR405 ( $He_6 = 0.49$ ), MfSSR413 ( $He_7 = 0.45$ ) and MfSSR424 ( $He_8 = 0.5$ ).

<sup>26,27,28</sup> In these conditions,  $p = (He_1 \times He_2 \times He_3 \times He_4 \times He_5 \times He_6 \times He_7 \times He_8)^{26} = 0.0041$ .

PCR was performed according to the following multiplex protocol (adapted from Zapater *et al.*<sup>27</sup> 15 min at 95 °C, 45 cycles of 30 s at 94 °C, 90 s at 57 °C and 90 s at 72 °C, and a 10 min final step at 65 °C. The reaction mixture (19 µl) included DNA (3 µl), QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (5 µl x 2), Q-solution (1 µl x 5) and each primer (0.5 µl). Forward and reverse primers were labelled with one of the following fluorescent dyes: NED, HEX, FAM, or PET (Applied Biosystems (ABI), Foster City, California, USA). Primers were tested in panels of four markers labelled with these different dyes. Diluted amplified PCR products were mixed with GeneScan-500LIZ size markers (ABI) and separated on a 16-capillary sequencer (ABI Prism 3130XL). They were sized and analyzed using GeneMapper software (ABI).

### **2.6 Experiment 3: Effect of possible fungicide contamination on the germ tube growth of conidia recovered after successive transfer of a same lesion over different fungicide media**

A group of 50 sporulating lesions was selected for this study. Each lesion was applied on fungicide-free agar medium (initial control), and then successively on three different media supplemented with the different fungicides: azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>), propiconazole (0.1 mg litre<sup>-1</sup>), thiophanate-methyl (5 mg litre<sup>-1</sup>), and finally on a fungicide-free medium (final control). The growth of germ tubes of conidia deposited on the different media was measured in the two controls (initial and final) to screen for a possible effect of successive applications on the fungicide-supplemented media on conidial germination. This experiment was carried out in triplicate. The germ tube growth data were submitted to a one-way ANOVA using the Minitab statistical software package (version 16), in order to evaluate the influence of the order of the control in the sequence of the different agar media used. The mean germ tube growth on the initial and final fungicide-free control media were separated with a Tukey test using the same software.

### **2.7 Experiment 4: Effect of leaf age on the frequency of resistant strains**

Two populations of conidia sampled from the top (7<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup> leaf) and bottom (11<sup>th</sup> to 13<sup>th</sup> leaf) of the canopy were compared to assess the effect of leaf age on the frequency of resistant strains. Ten lesions were sampled at each canopy level and the experiment was repeated on 18 randomly chosen banana trees in a plot in which the proportion of strains resistant to thiophanate-methyl was around 50 %. Conidia were germinated in the presence of thiophanate-methyl, as indicated in section 2.3.2., and the percentage resistance was calculated as described in section 2.3.4.

After arcsine transformation of the square root of the percentage of resistance, means were separated with a two-sample *t*-test using the Minitab statistical software package (version 16).

## **2.8 Experiment 5: Comparison of germination bioassays using ascospores and conidia from field lesions**

The aim was to assess the reliability of the resistance measurements via conidial germination tests in comparison to the reference method using ascospores. Stage 2-3 sporulating lesions and leaf necrosis were sampled as described in sections 2.3.2 and 2.3.1, respectively, on the same day and site. Samples were collected at different commercial plantations : Mantem, Penja-Est, Mussaka and Singa with different resistance levels. Lesion and leaf necrosis samples from each of the four sites were divided into three sub-samples for three replicates. At a different date, a sample was collected at a single site (Singa) and divided into five sub-samples for five replicates. Conidia and ascospores were cultured as described in sections 2.3.2 and 2.3.1, respectively, and the percentage resistance to thiophanate-methyl (5 mg litre<sup>-1</sup>) was calculated as indicated in section 2.3.4.

## **3. RESULTS**

### **3.1 Comparison of spore germination bioassays and molecular detection of target mutations conferring resistance to MBCs and QoIs**

#### *3.1.1 Detection of MBC-resistant strains*

The germination test showed that in the presence of thiabendazole and thiophanate-methyl, at 5 and 10 mg litre<sup>-1</sup>, no strains with twisted germ tubes (T) carried the E198A mutation and all strains with normal germination (N) or short germination (C) were carrying the E198A mutation that confers resistance (Table 2). The distribution of N, C and NG phenotypes in resistant strains varied according to the type of fungicide and rate. A greater proportion of strains with low germination (C) and no germination (NG) was noted in the presence of thiophanate-methyl at 10 mg litre<sup>-1</sup> (Table 2). Two strains did not germinate (NG) on this medium, and one was carrying the E198A mutation but not the other. On medium containing thiabendazole at 5 mg litre<sup>-1</sup>, strains carrying the E198A mutation mostly had a normal growth pattern (N).

### *3.1.2 Detection of QoI-resistant strains*

The results showed that in the presence of azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>) all strains bearing the G143A mutation and sensitive strains without the mutation could not be entirely differentiated on the basis of germ tube length ( $L_i$ ) or on the percentage of growth inhibition ( $GI_i$ ). However, all slightly inhibited strains ( $L_i > 120 \mu\text{m}$  and  $GI_i < 50 \%$ ) were found to be carrying the G143A mutation, whereas highly inhibited strains ( $L_i < 25 \mu\text{m}$  and  $GI_i > 70 \%$ ) did not have this mutation (Fig. 1). Within this range, some strains carrying the mutation were as strongly inhibited as strains without it.

When AoX was impeded by SHAM, azoxystrobin inhibited germ tube growth of the three strains that did not carry the G143A mutation, but did not inhibit the growth of the three strains carrying this G143A mutation (Tables 3 & 4). However, growth of strain SS1 (not carrying the G143A mutation) was poorly inhibited by azoxystrobin, as when AoX was not impeded (Fig1, Tables 3&4). By another hand, SHAM inhibited germ tube growth of the three strains carrying the G143A mutation.

### **3.2 Analysis of fungal diversity within all the conidia recovered from individual lesions**

#### *3.2.1 Homogeneity of resistance to thiophanate-methyl within all conidia recovered from the same lesion*

Each analysed lesion was successively applied 12 times on the same medium. The number of conidia decreased markedly between the first and twelfth application (Fig. 2), suggesting that these 12 successive applications made it possible to harvest almost all the conidia formed on the lesions. Figure 2 also shows clearly that, for highly sporulating lesions, sufficient conidia can be recovered after at least 4 successive applications to carry germination tests. Lesions produced 177 conidia on average, with extremes of 12 conidia for the lesion that had the least sporulated and 1800 for the most highly sporulating lesion.

A sensitive genotype (S) was attributed to a lesion when all harvested conidia had twisted or non-germinated germ tubes. A resistant genotype was attributed to a lesion when all harvested conidia had a normal or short germ tube along with some non germinated conidia (dead conidia). We considered that the lesion contained a mixture of genotypes when conidia with twisted, normal and short germ tubes could be simultaneously found. Of the 100 analysed lesions, 41% produced conidia that were exclusively resistant and 51% produced conidia that were exclusively susceptible, and only eight (8 %) had a mixture of resistant and sensitive genotypes (Table 5). Lesions in which a mixture of genotypes were detected consisted of a high majority genotype representing over 80 % of the conidia and a minority genotype that was often spatially grouped in one sector of the lesion (Table 6).

#### *3.2.2 Genetic diversity among conidia from the same lesion assessed using microsatellite markers*

Over the subsample of lesions studied, this analysis revealed that 10 lesions (30.3 %) had a mixture of two haplotypes (Table 7), whereas the germination tests were able to detect a mixture of genotypes in only four lesions (12.1 %). Note that two haplotypes were also found in the four

lesions in which the germination tests enabled the detection of a mixture of genotypes. The neutral genetic diversity analyses thus detected 2.5-fold more mixtures than the germination tests.

### **3.3 Effect of possible fungicide contamination on the germ tube growth of conidia recovered after successive transfer of a same lesion over different fungicide media**

The results showed a slight but significant ( $P=0.01$ ) reduction of germ-tube growth after successive transfer of a same lesion over different media, since germ tube growth was 252  $\mu\text{m}$  on initial fungicide-free agar and 236  $\mu\text{m}$  on the final fungicide-free agar. However, this effect was minor, with a decrease of only 7 % from the initial germination.

### **3.4 Effect of leaf age on the frequency of resistant strains**

The results showed that the level of resistance to fungicides varied at different leaf levels on the same banana tree (Table 8).

### **3.5 Comparison of germination bioassays using ascospores and conidia from field lesions**

In the ascospores germination tests, we observed a marked dispersion in individual repetition values. The confidence interval and coefficient of variation for the level of resistance to MBCs fungicides ( $27.0 < cv < 113.6$ ) was thus relatively high in these tests as compared to the conidial germination tests ( $19.5 < cv < 49.5$ ) in which the values for each repetition were less variable (Fig. 3).

## **4. DISCUSSION**

A routine bioassay to monitor sensibility of *Mycosphaerella fijiensis* to fungicides was developed using conidia sampled from early lesions (stage 2-3). We first hypothesised that all conidia from a single lesion are identical as they are asexually reproduced. In most cases, we actually only found a single genotype within individual lesions, but several genotypes still were detected in around 20 %

of lesions. Genetic diversity between conidia from the same lesion was analysed using two complementary approaches which yielded different information. First, the conidial germination tests conducted in the presence of thiophanate-methyl enabled us to analyse almost all the conidia of the 100 analysed lesions (up to 1800 conidia for the mostly sporulating lesion). This analysis revealed that conidial germination was generally uniform and that a high majority germination morphotype (resistant or susceptible) was usually present when there was a mixture of genotypes. The neutral genetic diversity analysis could only be performed on a smaller conidial sample, but the findings revealed twofold more genotype mixtures within individual lesions than detected in the germination tests. This result was expected because the resistance frequency in the farm where the lesions were collected was roughly 50 %, and hence, because loci are independent due to recombination,<sup>19</sup> the probability to not distinguish with a MBC germination test two isolates having different genotypes is about 50 %. The fact that minority and majority genotypes were spatially located in different parts of the lesion suggests that several separate infections might have occurred at adjacent sites on the leaf but these infections could not be differentiated when the lesion was cut-off. Such events are more likely to occur in cases of high infestation, as described for this pathogen.<sup>22</sup> Finally, the extent of genotype mixing observed might not be sufficient to question the relevance of using conidia from lesions in routine tests because: (i) this extent of mixing could likely be reduced by sampling lesions in the part of leaf areas where there is a very low young lesion density, (ii) our findings showed that when a mixture of genotypes was present there was usually a high majority genotype, and (iii) the different genotypes were distributed in different spatial areas within the lesion, which means that observations may be focused in the part of the lesion where there is uniform conidial growth.

We then sought to validate the bioassay, which was mainly designed to detect mutations via germination tests by comparing germination phenotypes grown on media supplemented or not with fungicides with the presence of the mutation conferring disruptive fungicide resistance. This relationship, concerning G143A and E198A mutations conferring resistance to QoIs and MBCs, respectively, had not been convincingly demonstrated to date. Regarding MBCs, we clearly showed

that the germination phenotypes enabled detection of the E198A mutation in all cases. In the presence of a fungicide (5 mg litre<sup>-1</sup>), strains bearing the E198A mutation had a normal (N) or short (C) germ tube, while strains without this mutation had a twisted germ tube (T) or did not germinate. This is in line with the findings of previous studies in which strains with a normal germ tube (N) were considered to be resistant whereas those with a twisted germ tube (T) were classified as sensitive.<sup>14,15,24</sup> However, our study revealed that strains with short germination (C) also carried the E198A mutation, contrary to the assumptions of the above authors. Our comparison of germination profiles in the presence of different fungicides (thiophanate-methyl and thiabendazole) and at different rates (5 and 10 mg litre<sup>-1</sup>) suggested that thiabendazole, at 5 mg litre<sup>-1</sup>, is better for differentiating resistant strains with normal (seldom inhibited) germination and sensitive strains with a twisted germ tube (T).

For QoIs, we showed that the germination inhibition level in the presence of azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>) did not enable us to determine the resistant (G143A mutation carrier) or sensitive (without the G143A mutation) status for all analysed strains. However, very slightly inhibited strains ( $L > 120 \mu\text{m}$  and  $\text{GI} < 50 \%$ ) were all carrying the G143A mutation, whereas highly inhibited strains ( $L < 25 \mu\text{m}$  and  $\text{GI} > 70 \%$ ) were not. Between these two groups, there was a range of moderately inhibited strains, some of which had the mutation and others not. Germination tests have been previously carried out to detect and quantify the proportion of QoI-resistant strains in *M. graminicola*,<sup>29</sup> *Botrytis cinerea*,<sup>30</sup> and *M. fijiensis*.<sup>10</sup> Several authors have suggested that *M. fijiensis* strains bearing the G143A mutation have a germ tube longer than 150  $\mu\text{m}$  in the presence of azoxystrobin at rates of 0.1 or 10 mg litre<sup>-1</sup>.<sup>1,12</sup> Here we showed that this germ-tube cut-off limit could be reduced to 120  $\mu\text{m}$  to encompass a greater number of strains bearing the G143A mutation, and also that this limit does not enable detection of all resistant strains and therefore underestimates their number. Germination tests thus enable detection of QoI-resistant strains but not accurate measurement of their proportion. Finally, our results suggest that the GI could be a more accurate indicator of the strain status, GI being less variable ( $\text{cv} = 0.41$ ) than the germ tube length ( $\text{cv} =$



0.93). Amongst moderately inhibited strains, those not carrying the G143A mutation could opt for an alternative oxidation pathway in order to continue growing when a QoI fungicide is present, however, this was not the case for the strain SS1, suggesting that this strain might carry another mutation than the G143A. Indeed, over 11 mutations or mutation combinations in the *cyt b* gene have been described as conferring resistance to QoIs in lab mutants, but only G137R, F129L and G143A mutations have been found up to now in field isolates of certain pathogens, and from which G143A mutants clearly lead to the highest resistance factors.<sup>32</sup> In the case of *M. fijiensis* the mutation G143A also leads to the highest resistant factor, but other mutations could lead to moderate resistance factors like for strain SS1. Finally, for strains bearing the G143A mutation but which are slightly inhibited, other mutations could also be present and this mutation combination could affect the strain fitness.

We have shown that using conidia sampled from early lesions enhanced the bioassay reproducibility. First, with conidia, we were able to conduct germination tests in all conditions, i.e. with samples originating from fungicide treated or untreated areas and regardless of the climatic conditions. In a global study aimed to compare the two methods (11 paired comparisons with three replicates during the dry season), 100 % of conidial germination tests were successfully performed, whereas 90 % of the ascospores germination tests could not be carried out due to a lack of ascospores production (data not shown). Moreover, only 10-50 % of cultured necrotic tissue fragments produced ascospores, whereas 94-100 % of cultured early lesions produced conidia, so tests performed with ascospores were less representative of the sampled population. Consequently, the proportion of resistant strains obtained in the ascospores germination test was much more variable than in the conidial germination tests. We have specified the conditions required for performing routine conidial germination tests. First, we confirmed that conidial production was regular under all climatic conditions, even in commercial treated farms, and we proposed a plan for sampling early lesions. We showed that resistance levels might differ between populations sampled at different canopy levels. Leaves of the same age (canopy level) should thus be collected to ensure

that the population obtained is representative of the same infection period. In practice, we propose to collect leaf fragments bearing stage 2-3 lesions on the youngest leaves with lesions (generally rows 7 to 8) on 25 just-flowering banana trees (flowering stage between shooting and horizontal finger stage) randomly distributed in the plot. We also suggest that two stage 2-3 lesions should be sampled per banana plant in order to obtain a population of 50 lesions (strains) per sample. Early isolated lesions should be cut from parts of the leaf blade where the lesion density is low in order to reduce the risk of obtaining a mixture of different genotypes within the same lesion. The lesions are then cut and highly sporulating lesions are selected after being lightly applied on the agar medium. Thereafter, 50 selected sporulating lesions are applied on the control medium and then successively on the different fungicide media to harvest the conidia population. The germ tube growth of conidia of the same genotype can thus be compared in the absence and presence of a fungicide. We showed that transferring the same lesion on different media could ultimately have a slight effect on germ tube growth. To overcome this problem, we suggest that, in routine tests and according to the different mode of action of different fungicides, lesions should be successively deposited on the following media: agar, [agar + DMI fungicide or Agar + QoI fungicide], and agar + MBC fungicide. The  $EC_{50}$  (concentration inhibiting 50 % of germ tube growth) may also be measured for DMI fungicides by depositing lesions on agar and then on several media containing increasing fungicide rates. If the aim is to assess the same strain with a broader range of fungicides, then the fungus could be cloned and conidia could be produced on artificial media and then deposited on the different media. Finally, in microscopic assessments, the observations should be focused on the same part of the lesion in order to avoid monitoring different genotypes when the lesion contains a mixture of genotypes.

In conclusion, germination tests performed with conidia obtained from early sporulating lesions overcame many problems commonly encountered during ascospores germination tests. Through these tests, it is possible: (i) to perform germination tests in a timely manner, (ii) to comply with a preset sampling plan, (iii) to overcome the problem of confusing *Mycosphaerella* species and (iv) to

compare the response of the same population on a control medium and on fungicide-supplemented media. For all of these reasons, we believe that the conidia-based method is a good alternative for more reliable assessment of resistance in *M. fijiensis*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the technical team of the Phytopathology Laboratory of CARBAP, Floribert Tchipe, Robert Dongmo, Sakio Kana, Joseph Essome, Henri Mpouli, Adolph Moussissa, Levi Noumtcheu and Clement Essoh for their technical support; PHP, CDC and SPM companies for giving us the access to their banana plantation; François Bonnot, François Delmotte, Jacques David and Anne-Sophie Walker for helpful discussions. This work was supported by a Europaid contract ATF/UE-N1146-762/786/798/801, and the authors are grateful to ASSO-BACAM for the administration of this project.

## BIBLIOGRAPHY

- 1- Marin DH, Romero R, Guzman M and Sutton T, Black sigatoka: an inceasing threat to banana cultivation. *Plant disease* **87**: 208-222 (2003).
- 2- De Lapeyre de Bellaire L, Foure E, Abadie C and Carlier J, Black Leaf Streak Disease is challenging the banana industry. *Fruits* **65**: 327–342 (2010).
- 3- Stover RH, Behavior of benomyl tolerant strains of the black Sigatoka pathogen in the field. *Proc. Am. Phytopathol. Soc.* **4**: 180-181 (1977).

- 4- Romero RA and Sutton TB, Characterization of benomyl resistance in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of black Sigatoka of banana, in Costa Rica. *Plant Disease* **82**: 931-934 (1998).
- 5- De Lapeyre de Bellaire L, Ngando J, Abadie C, Chabrier C, Blanco R, Lescot T, Carlier J, Cote F, Is chemical control of *Mycosphaerella* foliar diseases of bananas sustainable?, in *ISHS/ProMusa Symposium on 'Recent advances in banana crop protection for sustainable production and improved livelihoods', 10-14 September 2007*, Acta Horticulturae Book of abstract, White River South Africa, pp 25-30 (2007).
- 6- Romero RA and Sutton TB, Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of Black Sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopathology* **87**: 96–100 (1997).
- 7- Knight S, Wirz M, Amil A and Cook A, Fungicide resistance, in *Mycosphaerella fijiensis* Morelet: current status and outlook, *Proc 15th Acorbat Meeting*, Cartagena de Indias, Colombia, pp. 163–166 (2002).
- 8- Leroux P, Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Comptes Rendus Biologies* **326** : 9–21 (2003).
- 9- Sierotzki H, Parisi S, Steinfeld U, Tenzer I, Poirey S and Gisi U, Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome *bcl* enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Manag. Sci.* **56**: 833–841 (2000).
- 10- Chin KM, Wirz M and Laird D, Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Dis.* **85**: 1264–1270 (2001).
- 11- Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M and Parr-obrzenski B, Review the strobilurin fungicides. *Pest management science* **58**: 649-662 (2002).
- 12- Amil A, Cook A, Stanger C, Knight S, Wirz M, Shaw M, The dynamics of strobilurin (QoI's) sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis*, in *Costa Rica XV reunion international ACORBAT*, pp 158-162 (2002).
- 13- Arzanlou M, Groenewald JZ, Fullerton RA, Abeln ECA, Carlier J, Zapater MF,

- Buddenhagen IW, Viljoen A, Crous PW, Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia* **20** :19–37 (2008).
- 14- Cronshaw DK, Monitoring of Sigatoka disease (*Mycosphaerella musicola* ex Mulder) in the windward Island for tolerance to fungicide. *Fruits* **39** :163-165 (1984).
- 15- De Lapeyre de Bellaire L, Caractérisation de la sensibilité des souches de *Pseudocercospora musae* aux fongicides utilisés dans la lutte contre la Cercosporiose jaune du bananier en Guadeloupe. *Fruits* **45** :209-212 (1990).
- 16- De Lapeyre de Bellaire L and Risède J-M, A laboratory method to evaluate *Pseudocercospora musae*'s (teleomorph: *Mycosphaerella musicola*) sensitivity to fungicides. *Fruits* **63**: 53–56 (2008).
- 17- Essis B, Kobenan K, Traoré S, Koné D et Yatty J, Sensibilité au laboratoire de *Mycosphaerella fijiensis* responsable de la cercosporiose noire des bananiers vis-à-vis des fongicides couramment utilisés dans les bananeraies ivoiriennes. *JAPS* **7** : 822-833 (2010).
- 18- Jones DR, Diseases of banana, *abaca* and *enset*, CAB Int., Wallingf., UK, 2000.
- 19- Rieux A, de Lapeyre de Bellaire L, Zapater M-F, Ravigne V and Carlier J, Recent range expansion and agricultural landscape heterogeneity have only minimal effect on the spatial genetic structure of the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella fijiensis*. *Heredity*: 1–10 (2012).
- 20- Canas-Gutiérrez GP, Patino LF, Rodríguez–Arango E and Arango R, Molecular Characterization of Benomyl-resistant Isolates of *Mycosphaerella fijiensis*, Collected in Colombia. *J. Phytopathology* **154**: 403–409 (2006).
- 21- Lassoudière A, Le bananier et sa culture, Quae edition, Versailles, France (2007).
- 22- Fouré E, Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Études de la sensibilité variétale des bananiers et plantains à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

- au Gabon (maladie des raies noires). I. Incubation et évolution de la maladie. *Fruits* **37** : 749-759 (1982).
- 23- Abadie C, Zapater MF, Pignolet L, Carlier J and Mourichon X, Artificial inoculation on plants and banana leaf pieces with *Mycosphaerella* spp., responsible for Sigatoka leaf spot diseases. *Fruits* **63** : 319–323 (2008).
- 24- Smith CM, Trivellas AE, Johnson LEB and Joshi EE, Methods for monitoring the sensitivity of a range of fungal pathogens to benzimidazole fungicides. *EPPO Bulletin* **21** :336-340 (1991).
- 25- Halkett F, Coste D, Platero GG, Zapater MF, Abadie C and Carlier J, Genetic discontinuities and disequilibria in recently established populations of the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* **19** :3909–3923 (2010)
- 26- Neu C, Kaemmer D, Kahl G, Fischer D, Weising K, Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* **8** :523–525 (1999).
- 27- Zapater MF, Duchemin M, Dussart JF, Coste D, Brottier P, Carlier J, Microsatellite markers for the fungal banana pathogens *Mycosphaerella fijiensis*, *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella eumusae*. *Molecular Ecology Resources* **8** :1121-1125 (2008).
- 28- Robert S, Rieux A, Argout X, Carlier J and Zapater MF, Optimized genotyping with microsatellite markers in the fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis* (Mycosphaerellaceae). *American Journal of Botany*: e130-e132 (2010).
- 29- Kildea S, Dunne B, Mullins E, Cooke LR, Mercer PC and O’Sullivan E, Pyraclostrobin reduces germ tube growth of QoI-resistant *Mycosphaerella graminicola* pycnidiospores and the severity of *septoria tritici* blotch on winter wheat. *Plant pathology* **59** :1091–1098 (2010).
- 30- Banno S, Yamashita K, Fukumori F, Okada K, Uekusa H, Takagaki M, Kimura M and Fujimura M, Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene. *Plant Pathology* **58** :120–129 (2009).

- 31- Ziogas BN, Baldwin BC, and Young JE, Alternative respiration: a biochemical mechanism of resistance to azoxystrobin (ICIA5504) in *Septoria tritici*. *Pestic. Sci.* **50**: 28-34 (1997).
- 32- Gisi U, Chin KM, Knapova G, K  ng F  rber R, Mohr U, Parisi S, Sierotzki H, and Steinfeld U, Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop protection* **19** : 863-872 (2000).

Table 1. Isolates collected for the comparison of spore germination bioassays and molecular detection of mutations E198A and G143A, respectively, for detection of MBC- and QoI fungicide resistance.

Fungicides	Location	Number of isolates
MBC	Mbanga/Singa	52
QoI	Mbanga /Mideviv	1
QoI	Mbanga/Kumbe	2
QoI	Mbanga/Singa	2
QoI	Njombé/Njombé	1
QoI	Manjo/Lala	53
QoI	Penja/Penja Ouest	1

Table 2. Comparison of conidial germination phenotypes in the presence of various MBC fungicides and detection of the E198A mutation conferring resistance to MBC products.

Fungicides	Thiabendazole (5 mg litre <sup>-1</sup> )		Thiabendazole (10 mg litre <sup>-1</sup> )		Methyl-thiophanate (5 mg litre <sup>-1</sup> )		Methyl-thiophanate (10 mg litre <sup>-1</sup> )	
	Number of isolates showing the phenotype	Number of isolates carrying the E198A mutation	Number of isolates showing the phenotype	Number of isolates carrying the E198A mutation	Number of isolates showing the phenotype	Number of isolates carrying the E198A mutation	Number of isolates showing the phenotype	Number of isolates carrying the E198A mutation
Phenotypes								
T	21	0	21	0	21	0	20	0
N	30	30	27	27	22	22	5	5
N+C	1	1	4	4	9	9	5	5
C	0	0	0	0	0	0	19	19
C+NG	0	0	0	0	0	0	1	1
NG	0	0	0	0	0	0	2	1

T = distorted or twisted germ tubes; N = germ tubes with normal growth close to that of the fungicide-free control; C = non-distorted germ tubes but with short growth; NG = no germination; N+C = normal and short germ tube growth; C + NG = short germ tube growth and no germination.

Table 3. Comparison of germ tube length on a sub-sample of six resistant and sensitive isolates in the presence or not of salicylhydroxamic acid (SHAM) and in the presence or not of azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>).

Isolates	Genotypes	Germ tube length on different media (µm± standard deviation)			
		Control <sup>a</sup>	SHAM <sup>b</sup>	SHAM+Azoxystrobin <sup>c</sup>	Azoxystrobin <sup>d</sup>
SS3	Sensitive	303±12.6A <sup>e</sup>	252±13.1A	22±9.3B	58±17.5B
SS2	Sensitive	332±11.1A	333±11.3A	35±18.0B	34±11.0B
SS1	Sensitive	252±23.6A	207±14.3AB	100±1.1C	122±9.5BC
SR2	Resistant	298±36.6A	143±6.6B	149±2.8B	234±9.3A
SR1	Resistant	278±10.5A	97±11.4C	84±8.9C	247±9.7B
SR3	Resistant	335±20.2A	98±16.8B	95±28.5B	260±9.6A

<sup>a</sup>agar + methanol (1 ml litre<sup>-1</sup>) + dimethyl sulfoxide (DMSO) (1 mg litre<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup>agar + DMSO (1 mg litre<sup>-1</sup>) + SHAM (7.66 mg litre<sup>-1</sup>)

<sup>c</sup>agar + DMSO (1 mg litre<sup>-1</sup>) + SHAM (7.66 mg litre<sup>-1</sup>) + methanol (1 ml litre<sup>-1</sup>) + azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>)

<sup>d</sup>agar + methanol (1 mg litre<sup>-1</sup>) + azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>)

<sup>e</sup>means followed by the different letters are statistically different at 5%



Table 4. Comparison of growth inhibition on a sub-sample of six resistant and sensitive isolates in the presence or not of salicylhydroxamic acid (SHAM) and in the presence or not of azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>).

Isolates	Genotypes	Growth inhibition on different media (%± standard deviation)		
		SHAM <sup>a</sup>	SHAM + azoxystrobin <sup>b</sup>	Azoxystrobin <sup>c</sup>
SS3	Sensitive	16.3±7.45A <sup>d</sup>	93.0±2.93B	81.2±5.53B
SS2	Sensitive	0.64±0.64A	89.53±5.20B	90.03±2.98B
SS1	Sensitive	16.4±8.66A	59.35±4.41B	50.35±6.88B
SR2	Resistant	51.06±4.68B	48.50±6.13B	19.65±7.70A
SR1	Resistant	65.21±3.25B	69.95±2.03B	10.83±3.78A
SR3	Resistant	70.28±6.24B	70.7±10.5B	21.49±7.60A

<sup>a</sup>agar + DMSO (1 mg litre<sup>-1</sup>) + SHAM (7.66 mg litre<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup>agar + DMSO (1 mg litre<sup>-1</sup>) + SHAM (7.66 mg litre<sup>-1</sup>) + methanol (1 mg litre<sup>-1</sup>) + azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>)

<sup>c</sup>agar + methanol (1 mg litre<sup>-1</sup>) + azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>)

<sup>d</sup>means followed by the different letters are statistically different at 5%

Table 5. Detection of multiple infections within single lesions via the phenotypic germination pattern of all the conidia recovered from single lesions in the presence of thiophanate-methyl (5 mg litre<sup>-1</sup>). All the conidia of 100 lesions were analyzed in this study.

Type of lesion	Number of lesions per type of lesion	Number of conidia per type of lesion
R	41	6064
S	51	10317
R+S	8	1694
Total	100	18075

S: All conidia recovered from the lesion were twisted (T) or did not germinate (NG) in the presence of thiophanate-methyl (5 mg litre<sup>-1</sup>); R: All conidia from the lesion were normal (N) or short germinated (C). R+S: twisted conidia (T) and conidia with normal (N) or short (C) germ tubes were recovered from the same lesion.

Table 6. Distribution of susceptible and resistant germination phenotypes within the total population of conidia recovered from lesions showing a mixture of susceptible and resistant strains (type of lesion R+S). Analyses were carried out in the presence of thiophanate-methyl (5 mg litre<sup>-1</sup>).

N° of the lesion	Number of conidia per lesion	Number of conidia showing a resistant phenotype <sup>x</sup>	Number of conidia showing a susceptible phenotype <sup>y</sup>	Percentage of mixture <sup>z</sup>
L38	60	47	13	21.6
L48	94	6	88	6.4
L52	78	8	70	10.2
L78	77	4	73	5.2
L81	177	1	176	0.6
L87	12	1	11	8.3
L96	234	2	232	0.9
L97	1116	2	1114	0.2

<sup>x</sup>conidia twisted and without germination ; <sup>y</sup>conidia with normal or short germination; <sup>z</sup>proportion of the less frequent phenotype.

Table 7. Analysis of genotypic diversity among conidia produced on the same lesion using eight microsatellite markers on a sub-sample of 33 lesions.

N° of the lesion	Number of conidia on the lesion	Number of morphotypes (resistant or susceptible) on thiophanate-methyl (5 mg litre <sup>-1</sup> ) within the whole conidial population	Number of conidia cloned for microsatellite analyses	Number of haplotypes*
L12	97	1	8	1
L18	106	1	7	2
L19	25	1	8	2
L21	132	1	10	1
L22	46	1	8	1
L24	103	1	9	1
L26	47	1	12	1
L41	305	1	7	1
L33	16	1	10	1
L34	103	1	10	1
L36	40	1	7	1
L40	1668	1	16	1
L45	148	1	8	1
L48	94	2	10	2
L49	349	1	7	1
L50	51	1	8	1
L51	89	1	8	2
L55	126	1	16	2
L59	148	1	8	1
L68	122	1	10	1
L69	31	1	9	2
L72	84	1	12	1
L81	177	2	7	2
L83	60	1	8	1
L92	105	1	8	1
L93	68	1	7	1
L94	442	1	11	2
L95	527	1	8	1
L96	234	2	8	2
L97	1116	2	10	2
L98	488	1	10	1
L99	1201	1	6	1
L100	1036	1	9	1

\*one haplotype is the combination of different alleles at different loci (microsatellite markers). Allele 229; 230; 236 and 238 for MfSSR137 marker, allele 224 and 227 for MfSSR203 marker, allele 192; 195; 196 and 200 for MfSSR322 marker, allele 181 and 183 for MfSSR305 marker, allele 96 and 114 for MfSSR324 marker, allele 97 and 109 for MfSSR405 marker, allele 163; 171; 181 and 183 for MfSSR413 marker and allele 211 and 223 for MfSSR424 marker.

Table 8. Effect of the leaf age on the level of resistance to a MBC fungicide (thiophanate-methyl at 5 mg litre<sup>-1</sup>). Banana trees were selected just before flowering.

Age of leaves	Repetition	Percentage of resistance (%) $\pm$ standard deviation
<sup>x</sup> Young leaves	18	34 $\pm$ 14.6
<sup>y</sup> Old leaves	18	21 $\pm$ 19.8
p-value		0.028 <sup>z</sup>

<sup>x</sup> 7<sup>th</sup> to 8<sup>th</sup> leaves from the top of banana tree, <sup>y</sup> 11<sup>th</sup> to 13<sup>th</sup> leaves from the top of banana tree. <sup>z</sup>The *t*-test was significant at 5%.

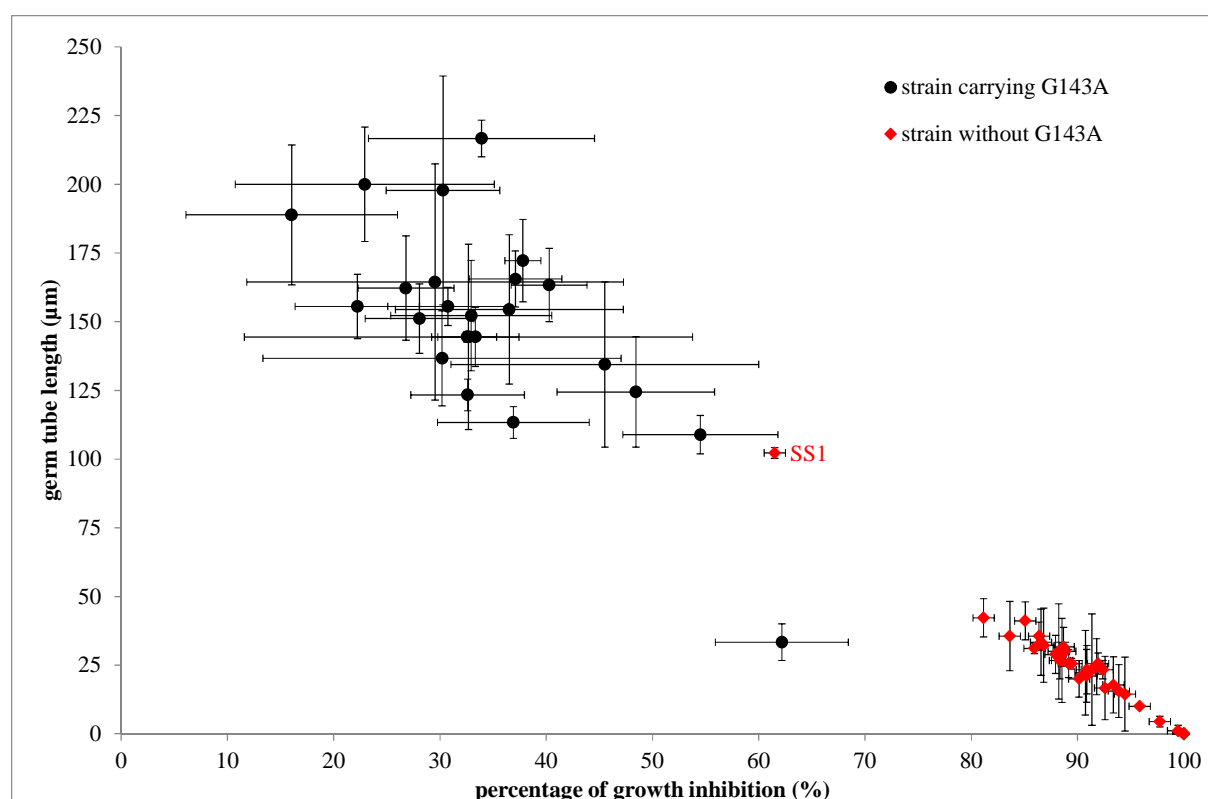


Fig. 1. Classification of strains carrying the G143A mutation (● black) and strains without the G143A mutation (♦ red) according to their germ tube length (L) and their percentage of growth inhibition (GI) in the presence of azoxystrobin (10 mg litre<sup>-1</sup>). Each point represents an average of L and GI of three repetitions per strain. Horizontal and vertical bars indicate the standard deviation for GI and L, respectively.

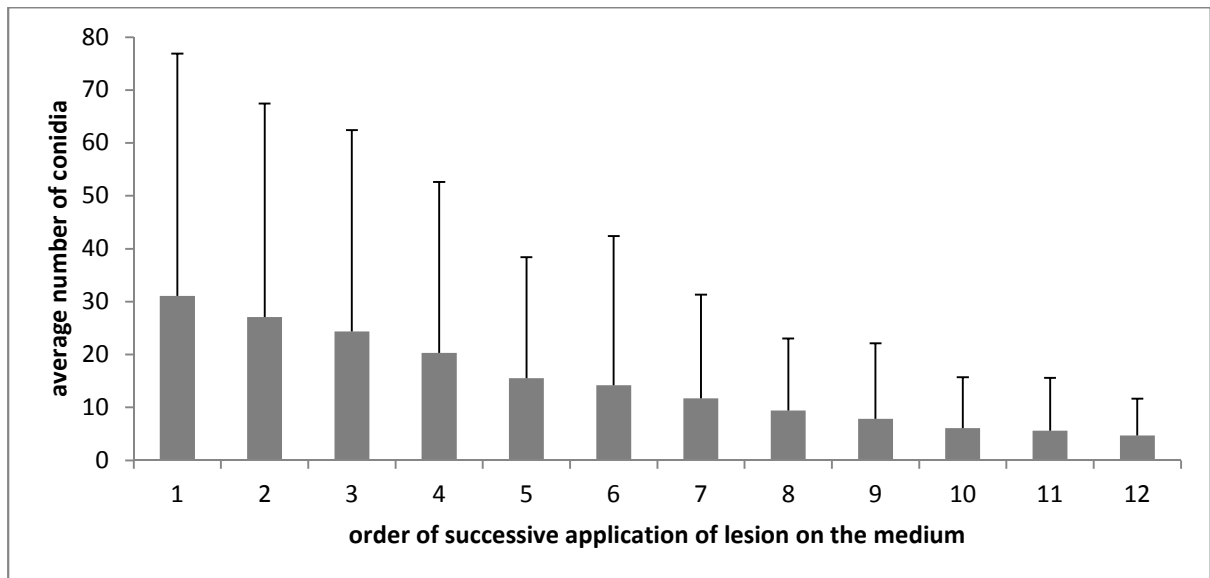


Fig. 2. Progressive reduction in the number of conidia recovered after successive application of lesions on agar. 100 replicates were carried out with 12 applications of each lesion. Error bars represent standard deviations.

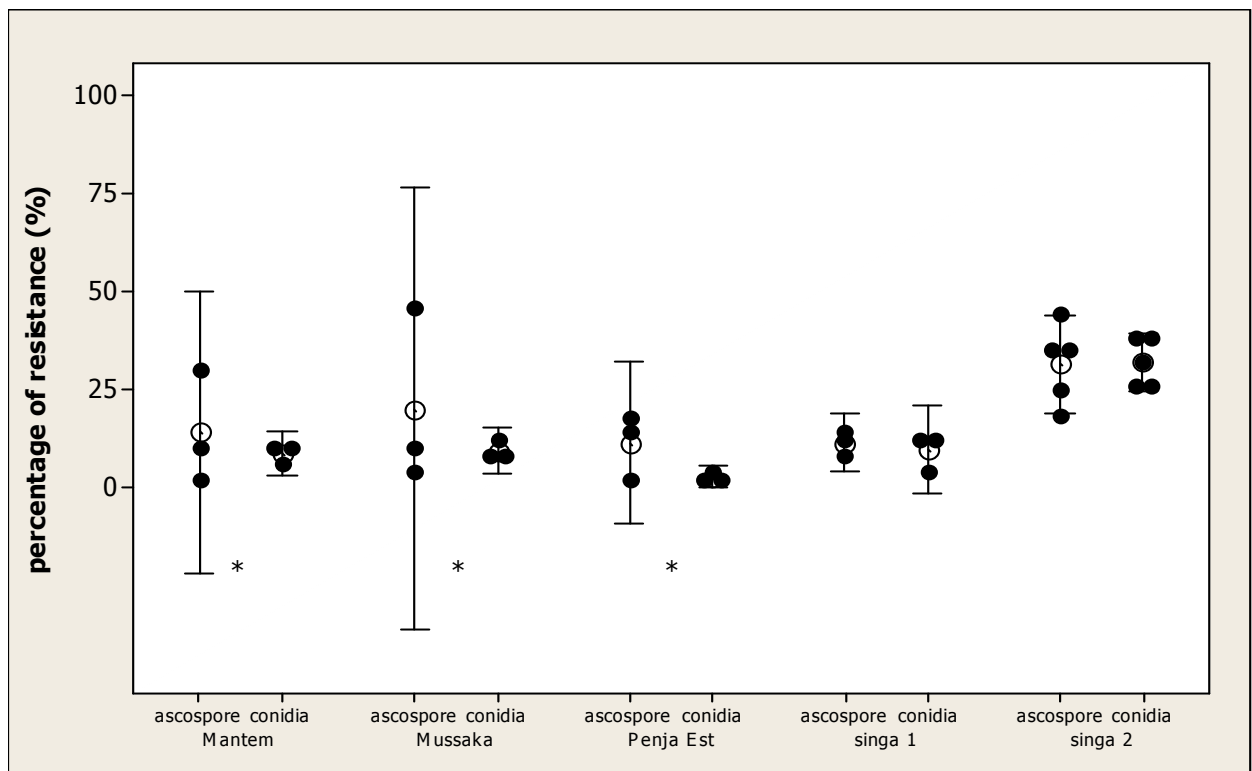


Fig. 3. Comparison of the level of resistance to MBCs evaluated by ascospore germination bioassays and conidia germination bioassays in samples originating from different commercial plantations. Three replicates of each bioassay were conducted in Mantem, Mussaka, Penja Est and Singa 1. Five replicates were conducted in Singa 2. Bars = confidence interval at 95 %; \* the test of equality of variance was significant at 5%; mean; ○ individual value. ●

Si la méthode conidie permet de détecter la présence de la mutation, elle pourrait être imprécise pour déterminer sa proportion (notamment dans le cas de QoI) du fait que les conidies provenant d'une lésion peuvent correspondre à différents génotypes. En revanche les conditions pour minimiser les effets de cette limite potentielle ont été précisées faisant de cette méthode un outil performant pour des monitorings de résistance de routine où le niveau de précision recherché est plus faible. Par ailleurs, pour servir dans les dispositifs de mesure de la sélection, la méthode conidie a apporté des techniques améliorées d'échantillonnage : (i) l'échantillonnage rapide de conidies (seules spores présentes dans les parcelles) directement à partir de jeunes lésions sporulantes ; (ii) le respect d'un plan d'échantillonnage, puisque tous les prélèvements ont été réalisés sur les mêmes bananiers au cours du temps ; (iii) le prélèvement sur les feuilles d'une même période d'infection permettant d'éviter des générations chevauchantes ce qui conditionne l'utilisation d'un modèle pour l'estimation d'un coefficient de sélection.

## III- CHAPITRE 2

### III.1- Estimation d'un coefficient de sélection et de contre sélection pour la résistance au fongicide QoI dans des populations de *Mycosphaerella fijiensis* soumises à l'effet de la sélection au champ

J. Ngando E., A. Rieux, F. Tchipe, A. Mehl, V. Ravigné, J. Carlier et L. de Lapeyre de Bellaire.

#### 1- Introduction

L'émergence de souches résistantes aux fongicides est devenue un sérieux problème à la suite de l'intensification de l'utilisation des fongicides systémiques au début des années 1970 (Leroux and Gardan, 2003). Le cas récent le plus dramatique a été le développement de la résistance aux QoI (inhibiteur de la respiration mitochondriale) seulement 2 ans après leur introduction (Sierotzki *et al.*, 2000). L'évolution de la résistance aux fongicides chez les champignons pathogènes dépend de l'interaction des différentes forces évolutives : la mutation, la sélection, la migration, la recombinaison et la dérive génétique. La mutation est la source fondamentale de la variation génétique et se traduit par l'apparition de nouveaux allèles dans une population (Mc Donald and Linde, 2002). La nouvelle mutation va ensuite pouvoir se déplacer d'une population à une autre sous l'effet de la migration, être associée à d'autres variations génétiques sous l'effet de la recombinaison et fluctuer en fréquence sous l'effet de l'interaction entre la dérive génétique et la sélection (Mc Donald and Linde, 2002). Parmi ces forces, la sélection joue un rôle important sur l'augmentation de la fréquence des mutants résistants en fonction de l'intensité des traitements fongicides, ce qui peut au final entraîner la perte du contrôle de la maladie (Hall *et al.*, 2004). On distingue deux modes de sélection : la sélection directionnelle et la sélection disruptive. La sélection directionnelle intervient dans le cas où la résistance est contrôlée par plusieurs mutations sur un ou plusieurs gènes et la fitness des individus en présence du fongicide est alors exprimée par un trait quantitatif (Georgopoulos and Skylakakis, 1986; Barton *et al.*, 2007). On observe alors des niveaux de résistance intermédiaires entre les niveaux les plus élevés et les plus faibles. A l'échelle de la population, les changements sont quantitatifs et l'effet de la sélection se traduit par une augmentation graduelle de la valeur moyenne du trait. La sélection disruptive concerne la résistance

contrôlée par un gène majeur. Les individus portant la mutation conférant la résistance ont alors une fitness très élevée en présence du fongicide. A l'échelle de la population les changements sont qualitatifs et l'effet de la sélection se traduit par une augmentation de la fréquence de la mutation conférant la résistance (Georgopoulos and Skylakakis, 1986; Scheinpflug, 1987).

Dans la pratique, les stratégies de gestion des souches résistantes reposent surtout sur des suivis réguliers de l'évolution de la fréquence des résistants au cours du temps afin d'adapter les stratégies de traitement. Souvent, des seuils arbitraires de fréquence des individus résistants sont employés pour orienter les décisions. Par ailleurs, des approches expérimentales pour tester des stratégies de gestion de la résistance ne sont pas toujours réalistes dans un contexte de production commerciale, d'autant plus que les processus évolutifs sont souvent longs et pas forcément compatibles avec une approche expérimentale (Van den Bosch and Gilligan, 2008). Cette difficulté a entraîné la prolifération de modèles mathématiques permettant de tester des stratégies de gestion de la résistance dans une approche globale en intégrant à la fois les forces évolutives, les pratiques culturales et même les facteurs climatiques (Hall *et al.*, 2004; Van den Bosch and Gilligan, 2008). Afin d'alimenter ces modèles, les paramètres des différentes forces doivent être mesurés de manière expérimentale pour prédire de manière réaliste l'évolution de la résistance (Van den Bosch and Gilligan, 2008). L'effet de la sélection peut être mesuré en conditions contrôlées ou directement au champ (Ennos and McConnell, 1995). Dans le cas d'un gène majeur (résistance disruptive) on mesure la fréquence initiale de l'allèle conférant la résistance au fongicide, puis on applique le fongicide et après plusieurs générations on détermine la nouvelle fréquence de l'allèle résistant. On déduit alors un coefficient de sélection par le fongicide lorsque celui-ci est appliqué et une contre-sélection lorsque celui n'est plus employé. On se met également à l'abri de flux de gènes extérieurs soit en confinant les expérimentations dans une serre ou en chambre de culture (Moretti *et al.*, 2003), ou en isolant la parcelle d'expérimentation loin des foyers de contaminations en fonction de la distance de dispersion du champignon. En conditions contrôlées on a une plus grande maîtrise de la composition de la population et de l'environnement. Ici on mélange artificiellement des résistants et des sensibles à une proportion donnée qu'on inocule en laboratoire sur l'hôte ou sur un milieu de culture en présence ou en absence du fongicide et on déduit un coefficient de

sélection ou une contre sélection. Cette approche a permis à certains auteurs de déterminer des valeurs de coefficients de sélection pour la résistance au benomyl chez *Venturia inaequalis* (Martin, 1982), et chez *Pyricularia oryzae* (Chin, 1987). Au champ, on a une maîtrise relativement faible de la composition de la population, mais surtout des conditions environnementales. La population initiale avant les traitements peut résulter de l'historique des pratiques et des flux migratoires à l'échelle de la parcelle étudiée, ou alors sa structure peut être modifiée par des introductions artificielles (de migrants résistants par exemple). Ces approches sont généralement beaucoup plus lourdes à mettre en œuvre et peu d'études de ce type ont été publiées (Metcalf *et al.*, 2000). Cependant de telles évaluations sont plus réalistes vis à vis d'un contexte de production et permettraient donc une meilleure inférence de l'effet de la sélection dans des modèles de gestion de la résistance.

L'émergence et de développement de souches résistantes aux fongicides est un problème important dans les populations de *Mycosphaerella fijiensis* agent causal de la maladie des raies noires (MRN) (Marin *et al.*, 2003; de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2010; Rieux *et al.*, 2014). En effet, ce champignon se caractérise par un fort potentiel adaptatif lié à son système de reproduction mixte (sexué et asexué), une taille efficace de population importante et une forte capacité de dispersion (Rieux *et al.*, 2014). La résistance chez *M. fijiensis* s'est développée pour tous les fongicides systémiques employés dans la lutte contre la MRN qui est la plus grande contrainte parasitaire des bananes d'exportation (de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2010). L'émergence de souches résistantes a été très rapide pour les fongicides dont la résistance est qualitative et liée à un gène majeur (les antimitotiques MBC et les inhibiteurs de la respiration QoI), et plus graduelle pour les fongicides dont la résistance est quantitative et liée à des mécanismes génétiques complexes (les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols du groupe 1 IBS1 ou DMI) (Marin *et al.*, 2003; de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2010). Chez *M. fijiensis* la résistance aux QoI est conférée par une seule mutation sur le gène mitochondrial du cytochrome b (*cytb*) aboutissant à la substitution de la glycine par l'alanine sur le codon 143 (G143A) de la protéine mitochondriale (Sierotzki *et al.*, 2000; Bartlett *et al.*, 2002). Dans le cas des QoI, l'apparition d'individus porteurs de la mutation G143A à des fréquences élevées a été très rapide, seulement deux à trois ans après l'utilisation de ces fongicides (Marin *et al.*, 2003; de Lapeyre de Bellaire *et al.*, 2010). Ainsi, l'étude de la dynamique d'évolution de la fréquence de



la mutation G143A dans les populations de *M. fijiensis* soumises à une pression de sélection par les fongicides du groupe des QoI représente un cas d'étude intéressant pour la mesure d'un effet de la sélection par ce fongicide. En effet, (i) l'évolution de la mutation G143A traduit bien un effet de la sélection par ces fongicides (Sierotzki *et al.*, 2000) ; (ii) il est possible de mesurer la fréquence de cette mutation au moyen de marqueurs moléculaires (Sierotzki *et al.*, 2000; Bartlett *et al.*, 2002) ; (iii) la rapidité attendue de l'évolution des fréquences de la mutation G143A est compatible avec une approche expérimentale ; (iv) la reproduction sexuée est abondante chez *M. fijiensis* et les populations sont généralement en équilibre gamétique, condition nécessaire pour la mesure d'un coefficient de sélection à partir de l'évolution de la fréquence d'une mutation sur un locus soumis à sélection (Milgroom *et al.*, 1989; Ennos and McConnell, 1995).

L'objectif de cette étude est d'évaluer un coefficient de sélection et de contre sélection en fonction de l'évolution de la fréquence de la mutation G143A de la résistance aux QoI dans des populations soumises à l'effet de la sélection selon une méthode proposée par Milgroom *et al.* (1989) et Ennos and Mc Connell (1995). Pour cela nous avons d'abord installé une parcelle expérimentale au champ à l'abri de flux de gènes extérieurs. Nous avons ensuite introduit des migrants pour installer un fond de résistance dans la parcelle. Nous avons ensuite appliqué une pression de sélection continue par les QoI en appliquant en continu ces fongicides. Lorsque la fréquence de la mutation G143A a été très élevée, les traitements ont été interrompus pour créer des conditions favorables à l'observation d'une contre-sélection des individus porteurs de la mutation G143A. Un deuxième dispositif a aussi été mis en place pour évaluer la dynamique de l'évolution de la résistance aux QoI sous l'effet combiné de la sélection et de la migration.

## **2- Matériels et méthodes**

### *2.1 Principe général de l'expérimentation*

Nous avons mis en place deux expérimentations au champ pour mesurer l'évolution de la fréquence de la mutation G143A dans des populations de *M. fijiensis*, sous l'effet des traitements par des fongicides à mode d'action QoI (Fig. 2). Un premier dispositif était situé dans un environnement sans bananiers, pas

le second. La fréquence initiale de la mutation G143A dans les populations de *M. fijiensis* représentatives des deux parcelles de bananiers a été mesurée avant l'application des traitements fongicides. Les bananiers ont ensuite été traités à intervalle régulier avec un fongicide à mode d'action QoI pour provoquer une augmentation de la fréquence de la mutation G143A. Lorsque la fréquence de la mutation G143A a atteint des niveaux très élevés, les traitements fongicides ont été stoppés. Cette évolution de la fréquence de la mutation G143A a servi à calculer un coefficient de sélection pour la résistance à ce fongicide durant la période où le fongicide était employé, et un coefficient de contre-sélection durant la période durant laquelle le fongicide n'était plus employé.

## *2.2- Description des dispositifs expérimentaux avant l'application des traitements fongicides*

### *2.2.1- Parcelle expérimentale non isolées de flux de gènes*

Cette parcelle expérimentale de 50 bananiers (variété Grande naine du sous-groupe Cavendish) était située sur la station expérimentale du Carpap à Njombé (9°63'N ; 4°60'E) (Fig. 1). Elle était localisée à un kilomètre des plantations commerciales traitées et directement en contact avec des bananiers plantains ne faisant l'objet d'aucune pratique de contrôle de la MRN (pas de traitements fongicides, pas d'effeuillage sanitaire). Cette parcelle n'était donc pas isolée des flux de gènes, mais la mutation G143A n'y a pas été détectée avant l'application des traitements.

### *2.2.2 Parcelle isolée des flux de gènes*

Cette parcelle expérimentale a été mise en place en avril 2009 sur le site de Maléké localisé en plein milieu d'une vaste zone de culture de palmier à huile localisée dans le Sud-Ouest Cameroun (4°74'N ; 5°60'E) (Fig. 1). Cet endroit a été choisi pour plusieurs raisons : (1) ces vastes étendues de palmier à huile fournissent des zones sans bananiers hôte de *M. fijiensis* permettant de limiter les sources potentielles de contaminations extérieures ; (2) les zones commerciales de production de bananes sont éloignées de plus de 50 km, excluant la possibilité d'introduction de la mutation G143A par des flux de gènes extérieurs. Une parcelle de 550 bananiers (cultivar Grande naine du sous-groupe Cavendish) a été plantée avec des bulbes de bananiers à rejets attenants provenant des plantations commerciales de banane. Un fond de résistance a été introduit dans cette parcelle afin d'accélérer les processus de

sélection par les fongicides. Pour cela nous avons tout d'abord identifié une source d'inoculum abondant dans laquelle une fraction de la population portait la mutation G143A. Cette source a été localisée dans une parcelle de bananiers plantains non traités (nombreuses plages nécrotiques porteuses d'ascospores) située aux alentours d'une parcelle commerciale dans laquelle la mutation G143A était présente à une fréquence de 0,188. Des analyses ont montré que la mutation G143A était présente sur certains des plantains jouxtant la parcelle commerciale (Fig. 3). De larges plages nécrotiques ont été prélevées et introduites (cinq prélèvements espacés de quatre semaines) pour installer une épidémie dans la parcelle de 550 bananiers (Fig.4). Après ces différentes introductions, nous avons laissé l'épidémie s'installer, et avant le démarrage des traitements nous avons pratiqué des ablations sévères des plages nécrotiques afin éliminer toute source d'ascospores (spores sexuées) et favoriser uniquement le développement de conidies (spores asexuées) sur des jeunes lésions. Les plages nécrotiques ont été régulièrement éliminées pendant toute la durée de l'expérimentation pour maintenir à des faibles niveaux la taille de la population.

### *2.2.3 Mesure initiale de la taille de la population*

La taille de la population fongique initiale a été mesurée pour avoir une idée de la migration résiduelle présente sur le site. Elle a été estimée en comptant toutes les jeunes lésions de stades 2 à 4 (selon l'échelle de Fouré (1988)) sur les étages foliaires allant de la 3<sup>e</sup> à la 5<sup>e</sup> feuille du bananier. Les comptages ont été faits sur 10 bananiers de la parcelle isolée des flux de gènes, juste avant l'introduction de l'épidémie. Des comptages ont également été faits sur 20 bananiers situés dans une parcelle proche de la station expérimentale du Carbap pour estimer la taille de la population dans une parcelle non traitée et entourée de bananiers non traités.

### *2.3- Application de la pression de sélection par les traitements fongicides*

Deux fongicides QoI ont été employés, la trifloxystrobine (Tega 75 EC, 75 g litre<sup>-1</sup>, fourni par Bayer CropScience) et l'azoxystrobine (Bankit 25 SC, 250 g litre<sup>-1</sup>, fourni par Syngenta).

Pour créer des conditions propices à la sélection par les QoI, les fongicides ont été appliqués à intervalle de 7 à 10 j dans les deux parcelles. Ainsi, toutes les feuilles et particulièrement la nouvelle

feuille émise de chaque bananier ont été traitées à l'aide d'un pulvérisateur à dos (Fig. 5). Dans la parcelle qui n'était pas isolée des flux de gènes, 39 traitements ont été appliqués durant 300 j à partir de janvier à octobre 2010 avec le Bankit 25 SC à la dose de 100 g d'azoxystrobine par hectare dans 20 L d'eau additionné d'un adjuvant Triton X 100 à la dose de 1‰. Dans la parcelle isolée des flux de gènes, 34 traitements ont été appliqués durant 356 j de septembre 2011 à août 2012 avec le Tega 75 EC à la dose de 100 g de trifloxystrobine par hectare dans 20 L d'eau additionné d'un adjuvant Triton X 100 à la dose de 1‰.

## 2.2- *Mesure de la fréquence de la mutation G143A*

### 2.5.1- *L'échantillonnage*

Sur la parcelle isolée des flux de gènes, 10 jeunes lésions (stades 2-3) ont été collectées sur la 5<sup>e</sup> feuille de 96 bananiers répartis de manière aléatoire sur l'ensemble de la parcelle. Pour chaque lésion un disque de 2 mm de diamètre a été découpé au laboratoire et séché pendant 24 heures à 55 °C avant d'être conservé à -20°C. Les 10 lésions d'un même bananier ont été regroupées dans un même échantillon. Chaque échantillon a été analysé séparément. Ce prélèvement a permis de constituer un échantillon composite de 960 lésions. A chaque date de prélèvement, les lésions ont été prélevées sur les mêmes bananiers (Fig. 6). Un prélèvement a été fait le 7 septembre 2011 avant les traitements, deux autres le 19 janvier et le 4 mai 2012 pendant la période durant laquelle les fongicides étaient appliqués et deux derniers prélèvements ont été réalisés après l'arrêt des traitements le 22 décembre 2012 et le 19 mars 2013 (Fig. 2).

Sur la parcelle soumise aux flux de gènes, 12 lésions (stades 2-3) ont été collectées sur la 5<sup>e</sup> feuille de 8 bananiers distribués de manière aléatoire. Ce prélèvement a ainsi permis de constituer un échantillon composite de 96 lésions. A chaque date de prélèvement, les lésions ont été prélevées sur les mêmes bananiers (Fig. 6). Au total 6 échantillons ont été prélevés respectivement le 7 janvier, 20 mars, 6 avril, 10 juin, 27 août et le 3 octobre 2010 (Fig. 2).

### 2.5.2- *Mesure des fréquences de la mutation G143A*

L'extraction de l'ADN a été faite sur les différents lots de disques de lésion à l'aide de la procédure décrite par Robert *et al.* (2010). Une PCR a été réalisée pour amplifier une portion de 77 bp du gène du cytochrome b contenant la mutation G143A qui confère la résistance aux QoI à l'aide de la méthode décrite par Rieux *et al.* (2013). La détection moléculaire et la fréquence de la mutation G143A sur les produits PCR a été réalisée à l'aide de la technique de pyroséquençage à Bayer CropScience, Research Disease control, Monheim, Allemagne selon la méthode décrite par Rieux et al. (2014).

### 2.3- Evaluation du coefficient de sélection par les QoI chez *M. fijiensis*

En présence de fongicide si on suppose qu'un génotype résistant a une fitness de 1, la fitness du génotype sensible relatif est  $(1 - s)$ ,  $s$  étant le coefficient de sélection des génotypes résistants ou contre les génotypes sensibles (Barton *et al.*, 2007). Pour évaluer le coefficient de sélection, Milgroom *et al.* (1989) ont adapté le modèle de Crow et Kimura (1970) au cas des champignons (ascomycètes et deuteromycètes) haploïdes chez lesquels il n'y a pas de relation de dominance. Ce modèle a été appliqué dans le cas spécifique de la résistance aux fongicides a été utilisé pour calculer le coefficient de sélection  $s$  associé à l'évolution de la fréquence allélique de la mutation G143A au cours du temps.

Soit  $p$ , la fréquence de la mutation G143A à un temps  $t$ .  $p$  peut être exprimée en fonction de sa fréquence  $p_0$  au temps initial, selon l'équation suivante (Milgroom *et al.*, 1989) :

$$\frac{p}{1-p} = \frac{p_0}{1-p_0} e^{st}$$

$p_0$  la fréquence de la mutation G143A avant l'application des traitements,  $s$  le coefficient de sélection.  $t$  est le temps exprimé en génération ou en cycle de production conidienne (1 génération = 14 jours).

$s$  quantifie le taux auquel la fréquence de la mutation G143A augmente avec le temps à cause de la sélection.  $s$  peut être estimé par la pente d'une régression linéaire de  $\text{Log}(p/(1-p))$  en fonction du temps. Afin de prendre en compte la variabilité qui existe dans les stratégies d'échantillonnages au sein des différents sites et des différentes dates, nous avons considéré que les fréquences observées suivent une distribution binomiale. Cela permet de calculer la vraisemblance du coefficient de sélection où on a un nombre de résistants sur un nombre d'échantillons testés à chaque date. A un site donné, la

vraisemblance du jeu de données total est le produit des vraisemblances des différentes dates. La vraisemblance a alors été maximisée pour la pente  $s$  à l'aide de la fonction Maximise de Mathematica 7.0 (Wolfram Research, Inc.). Les intervalles de confiance ont été estimés en échantillonnant deux unités autour de la valeur maximale de la vraisemblance obtenue.

Dans la parcelle isolée de flux de gènes,  $s$  a été la valeur réelle, alors que pour la parcelle exposée aux flux de gènes la valeur de  $s$  a été calculée sous l'hypothèse qu'il n'y aurait pas de migration.

### **3- Résultats**

#### *3.1- Taille des populations dans la parcelle isolée avant l'introduction d'un fond de résistance*

La taille de la population a été estimée avant l'installation d'une épidémie dans la parcelle isolée des flux de gènes. Cette taille de population a été comparée à celle d'une parcelle non traitée et environnée d'autres parcelles (flux de gènes importants). Un faible nombre de lésions a été observé dans la parcelle isolée des flux de gènes avant l'installation de l'épidémie (122 lésions par bananier en moyenne). En comparaison le nombre de lésions était 23 fois plus élevé (2870 lésions par bananier) dans la parcelle de référence non traitée, ce qui indique la forte intensité de la migration dans ce parcelle (Tableau 1).

#### *3.2- Présence de la mutation G143A dans les populations avant traitement*

La mutation G143A n'était pas présente avant la mise en œuvre des traitements dans la parcelle non isolée des flux de gènes. En revanche, la fréquence de la mutation G143A dans la parcelle isolée des flux de gènes était de 0,0135 avant l'application des traitements, démontrant ainsi que la population de migrants apportée dans la parcelle avait bien permis d'installer un fond de résistance au sein de la population.

#### *3.3- Effet des traitements fongicides sur l'évolution de la fréquence de la mutation G143A*

Dans les deux dispositifs expérimentaux les traitements fongicides ont provoqué une augmentation de la fréquence de la mutation G143A. Dans les deux cas l'évolution de la fréquence de résistants s'est déroulée en deux phases : dans la parcelle isolée de flux de gènes on a une phase exponentielle et une phase d'équilibre lente lorsque la fréquence était très élevée ; dans la parcelle exposée aux flux de gènes

on a eu une phase lente d'émergence et d'établissement de la mutation et une phase de croissance exponentielle (Fig. 7).

Dans la parcelle exposée aux flux de gènes, les traitements ont démarré en janvier 2010 et ont été arrêtés en octobre 2010, soit une période de 300 jours. Au total 39 traitements fongicides consécutifs ont été appliqués sur la parcelle au cours de l'expérimentation. Durant les 120 premiers jours, l'augmentation de la fréquence de la mutation G143A a été lente, passant de 0 à 0,050. Après cette période, la fréquence de la mutation G143A a augmenté très rapidement, passant de 0,206 à 0,782 en 78 jours ( $j+185$  à  $j+263$ ). Au terme de 300 jours, la fréquence de la mutation G143A était de 0,918 (Fig. 7).

Dans la parcelle isolée des flux de gènes les traitements ont démarré en début septembre 2011 et ont pris fin en août 2012 soit une période de 356 jours. Au total 34 traitements consécutifs du fongicide ont été réalisés. L'augmentation de la fréquence de la mutation G143A a été très rapide sur ce dispositif, passant de 0,0135 à 0,952 ( $j+134$ ) en seulement 134 jours (Fig. 7). A 240 jours, tous les individus échantillonnés portaient la mutation G143A.

#### *3.4- Estimation d'un coefficient de sélection*

Un coefficient de sélection a pu être estimé dans le dispositif isolé des flux de gènes (Tableau 2). Dans ces conditions nous avons obtenu un coefficient de sélection de 0,7546 en 17 cycles de production conidienne ( $j+240$ ). Sur le deuxième dispositif qui n'était pas isolé des flux de gènes, nous avons fait la même estimation d'un coefficient de sélection en faisant l'hypothèse qu'il n'y avait pas de flux de gènes. Dans ces conditions, nous avons alors obtenu une valeur plus faible de  $s$  (0,4228) sur un temps plus long de 22 cycles de production conidienne ( $j+300$ ).

#### *3.5- Evolution de la fréquence de la mutation G143A après l'arrêt des traitements fongicides*

Dans la parcelle isolée des flux de gènes, les traitements ont été stoppés en août 2012. La fréquence de la mutation G143A a faiblement chuté passant de 1 à 0,966 et 0,965 en 14 cycles de production conidienne après l'arrêt des traitements (Fig. 7).

### **4- Discussion**

La présente étude est la toute première ayant mesuré un effet de la sélection pour la résistance aux fongicides chez *M. fijiensis*. Il s'agit également d'une des rares études où l'effet de la sélection a été étudié au champ dans des conditions qui se rapprochent le plus des conditions réelles. Compte tenu de la difficulté de mettre en œuvre ces expérimentations au champ, la plupart des travaux antérieurs qui traitent de la mesure la sélection pour la résistance aux fongicides chez divers pathogènes ont été réalisés en conditions contrôlées (Ennos and McConnell, 1995; Moretti *et al.*, 2003). La principale difficulté était donc de contrôler la migration, c'est pourquoi la parcelle expérimentale a été isolée des bananiers au milieu d'un vaste ensemble de plantations commerciales de palmier à huile. Le nombre de lésions observé sur les bananiers dans la parcelle isolée des flux de gènes était très inférieur (plus de 20 fois) au nombre de lésions observé sur une parcelle non traitée entourée de bananiers. Cette observation montre que les flux de gènes ont été relativement limités sur ce dispositif, même si on ne peut pas considérer que la migration était nulle.

La validité de notre estimation du coefficient de sélection repose sur l'application des conditions d'utilisation du modèle de Milgroom *et al.* (1989), relatives à l'équilibre gamétique et l'absence de flux de gènes. Tout d'abord chez *M. fijiensis* seule la mutation G143A confère la résistance aux QoI (Sierotzki *et al.*, 2000). Chez *M. fijiensis* les populations sont panmictiques et la reproduction sexuée occupe une place importante (Rieux *et al.*, 2012) et généralement ces populations sont en équilibre gamétique. Par la suite, nous nous sommes mis en condition de faibles flux de gènes pour optimiser la mesure de la sélection. Dans les conditions avec des flux de gènes limités, nous avons obtenu un coefficient de sélection de 0,7546 au cours de cette étude (Tableau 2). Cette valeur est très élevée par rapport à ce qui a été obtenu par d'autres auteurs pour la résistance à un autre fongicide à mode d'action unisite MBC, chez certains pathogènes. En effet, ces auteurs ont obtenu des valeurs plus faibles pour la résistance au benomyl chez *V. inequalis* 0,215 (McGee and Zuck, 1981) et 0,219 (Martin, 1982) et 0,103 chez *P. orizae* (Chin, 1987). Cette différence de coefficients de sélection entre les deux types de fongicides un antimitotique (MBC) et un inhibiteur de la respiration mitochondriale (QoI) semble toutefois cohérente avec l'historique du développement des résistances correspondantes. En effet, une augmentation rapide de la fréquence des résistants aux QoI est largement connue lors de l'utilisation de ce fongicide sur diverses cultures (Ma



and Michailides, 2005). Les premiers fongicides QoI ont été introduits en 1996, et en 1998 pour la première fois les souches résistantes chez *Erysiphe graminis* ont été détectées sur le blé en Allemagne (Bartlett, 2002). Par la suite la résistance s'est généralisée chez d'autres pathogènes et cultures telles que *Phytophthora viticola* sur la vigne en France et en Italie, chez *V. inaequalis* de la pomme en Allemagne (Gisi *et al.*, 2000). Pour le cas de *M. fijiensis* la résistance a été très rapide dans les pays producteurs de banane, après trois ans d'utilisation au Costa Rica (Marin *et al.*, 2003) et deux ans au Cameroun. Cette rapidité peut s'expliquer par le déterminisme génétique qui est mitochondrial chez l'haploïde *M. fijiensis*, cet organelle cellulaire est entièrement transmis à la descendance par les individus femelles (Gisi, 2002). Par contre le développement de la résistance aux MBC chez *M. fijiensis* a été généralement plus lent entre 2 à 10 ans après leur introduction (Marin *et al.*, 2003). Une explication possible de cette différence réside dans la taille efficace des ADN mitochondriaux présents dans la cellule par rapport à celle de l'ADN nucléaire support de la résistance pour les antimétabolites. En effet, chez les cellules fongiques, il y a environ 30 fois plus de mitochondries contre un seul noyau, ce qui suggère que la probabilité d'apparition d'une mutation est plus élevée chez les mitochondries que dans le noyau. Puis sous l'effet de la sélection il y a une augmentation rapide de mitochondries portant la mutation.

Sur le deuxième dispositif qui n'était pas isolé des flux de gènes, la valeur du coefficient de sélection, estimée en faisant l'hypothèse que seul l'effet de la sélection rend compte de l'évolution de la fréquence de la mutation G143A, était environ deux fois plus faible (0,4228) que celle obtenue dans le premier dispositif isolé des flux de gènes. Cette différence suggère que dans ce cas là, des flux migratoires de souches sensibles ne portant pas la mutation G143A se seraient opposés à l'effet de la sélection. Cette observation semble également montrer que les flux de gènes ont été maîtrisés dans le premier dispositif, ce qui renforce la qualité de l'estimation du coefficient de sélection.

La dynamique d'évolution de la fréquence de la mutation G143A n'a pas été la même dans les deux dispositifs. En effet, dans le dispositif isolé des flux de gènes la croissance de la fréquence de la mutation G143A a été très rapide, sans phase d'installation de la mutation. Cette différence pourrait provenir d'une part du fait qu'un fond de résistance avait été introduit avant le démarrage des

traitements dans le dispositif isolé des flux de gènes, et pas dans le second et d'autre part de l'effet de la migration qui s'oppose à la sélection. Ce résultat est cohérent avec les observations de zur Wiesch (2011) et Georgopoulos et Skylakakis (1986) qui suggèrent que la dynamique de l'évolution de la résistance dépend ou non de la présence de la mutation dans la population de base. Si elle n'existe pas, son émergence va dépendre du taux de mutation et de la migration extérieure.

Dans cette étude, nous avons changé les conditions environnementales en arrêtant les traitements dans la parcelle isolée pour mesurer une contre sélection. Les résultats préliminaires ont montré une très légère variation de la fréquence de la mutation G143A, ce qui suggère la présence d'un polymorphisme à partir duquel la fréquence des résistants pourrait diminuer. Cette évolution serait le résultat de la contre sélection des résistants en absence de fongicide à laquelle une faible migration extérieure de souches sensibles pourrait se rajouter.

En conclusion, un fort coefficient de sélection pour la résistance QoI a été obtenu dans des conditions expérimentales au champ où les flux de gènes ont été relativement bien limités. Ainsi, le coefficient de sélection que nous avons inféré à partir de l'augmentation de la fréquence de la mutation G143A apparaît donc réaliste et adapté aux conditions réelles de production au champ. La valeur du coefficient de sélection ainsi estimée permettra d'alimenter un modèle de régulation de la résistance aux fongicides (intégrant d'autres forces évolutives) afin de prédire son évolution.

## Références bibliographiques

- Bartlett, D.W., Clough, M. J., Godwin, J. R., Hall, A., Hamer, M., and Parr-Dobrzanski, B., 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58, 649-662.
- Barton, N.H., Briggs, D.E.G., Eisen, J.A., Golstein, D.B., Patel, N.H., 2007. Evolution. Inglis, J., New york.
- Chin, K., 1987. A simple model of selection for fungicide resistance in plant pathogen populations. *Phytopathology* 77, 666-669.
- Crow, J.F., Kimura, M., 1970. An introduction to population genetics theory. An introduction to population genetics theory.
- de Lapeyre de Bellaire, L., Foure, E., Abadie, C., Carlier, J., 2010. Black Leaf Streak Disease is challenging the banana industry. *Fruits* 65, 327-342.
- Ennos, R., McConnell, K., 1995. Using genetic markers to investigate natural selection in fungal populations. *Canadian Journal of Botany* 73, 302-310.

- Georgopoulos, S., Skylakakis, G., 1986. Genetic variability in the fungi and the problem of fungicide resistance. *Crop Protection* 5, 299-305.
- Gisi, U., Chin, K., Knapova, G., K $\ddot{u}$ ng F $\ddot{a}$ rber, R., Mohr, U., Parisi, S., Sierotzki, H., Steinfeld, U., 2000. Recent developments in elucidating modes of resistance to phenylamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Protection* 19, 863-872.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., and McCaffery, A., 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58, 859-867.
- Hall, R.J., Gubbins, S., Gilligan, C.A., 2004. Invasion of drug and pesticide resistance is determined by a trade-off between treatment efficacy and relative fitness. *Bulletin of Mathematical Biology* 66, 825-840.
- Leroux, P., Gardan, L. (Eds.), 2003. La lutte chimique en phytopathologie. De Boeck et Larcier, Bruxelles.
- Ma, Z., Michailides, T.J., 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24, 853-863.
- Marin, D.H., Romero, R., Guzman, M., Sutton, T.B., 2003. Black sigatoka: an inceasing threat to banana cultivation. *Plant disease* 87, 208-222.
- Martin, D., 1982. Contribution à l'étude du pouvoir pathogène et de la résistance au bénomyl de *Venturia inaequalis* cke Wint. Compétition entre biotypes et hérédité des caractères. Paris-Sud Orsay, Paris, p. 115.
- Mc Donald, B.A., Linde, C., 2002. Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology* 40, 349-379.
- McGee, D., Zuck, M., 1981. Competition between benomyl-resistant and sensitive strains of *Venturia inaequalis* on apple seedlings [Fungicide tolerance]. Science Monograph University of Wyoming, Agricultural Experiment Station.
- Metcalf, R., Shaw, M., Russell, P., 2000. The effect of dose and mobility on the strength of selection for DMI fungicide resistance in inoculated field experiments. *Plant Pathology* 49, 546-557.
- Milgroom, M.G., Levin, S.A., Fry, W.E., 1989. Population genetics theory and fungicide resistance. *Plant disease epidemiology* 2, 340-367.
- Moretti, M., Arnoldi, A., D'Agostina, A., Farina, G., Gozzo, F., 2003. Characterization of field-isolates and derived DMI-resistant strains of *Cervospora beticola*. *Mycol. Res.* 107, 1178-1188.
- Rieux, A., De Bellaire, L.D.L., Zapater, M., Ravigne, V., Carlier, J., 2012. Recent range expansion and agricultural landscape heterogeneity have only minimal effect on the spatial genetic structure of the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella fijiensis*. *Heredity* 110, 29-38.
- Rieux, A., Lenormand, T., Carlier, J., Lapeyre de Bellaire, L., Ravigné, V., 2013. Using neutral cline decay to estimate contemporary dispersal: a generic tool and its application to a major crop pathogen. *Ecology letters* 16, 721-730.
- Rieux, A., Soubeyrand, S., Bonnot, F., Klein, E.K., Ngando, J.E., Mehl, A., Ravigne, V., Carlier, J., de Lapeyre de Bellaire, L., 2014. Long-Distance Wind-Dispersal of Spores in a Fungal Plant Pathogen: Estimation of Anisotropic Dispersal Kernels from an Extensive Field Experiment. *PloS one* 9, e103225.
- Robert, S., Rieux, A., Argout, X., Carlier, J., Zapater, M.-F., 2010. Optimized genotyping with microsatellite markers in the fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis* (Mycosphaerellaceae). *American journal of botany* 97, e130-e132.
- Scheinflug, H., 1987. Fungal resistance to setrol biosynthesis inhibitors: a new challenge. *Plant Disease* 71, 1066-1074.

Sierotzki, H., Parisi, S., Steinfeld, U., Tenzer, I., Poirey, S., Gisi, U., 2000. Mode of resistance to respiration inhibitors at the cytochrome bc1 enzyme complex of *Mycosphaerella fijiensis* field isolates. *Pest Management Science* 56, 833-841.

Van den Bosch, F., Gilligan, C.A., 2008. Models of fungicide resistance dynamics. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 123-147.

zur Wiesch, P.A., Kouyos, R., Engelstädter, J., Regoes, R.R., Bonhoeffer, S., 2011. Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases. *The Lancet infectious diseases* 11, 236-247.

Tableau 1. Quantification des infections sur des bananiers de deux sites respectivement soumis à de forts et faibles flux de gènes. Les évaluations ont été réalisées sur les cinq premières feuilles de chaque bananier. 10 bananiers au stade de croissance 8 feuilles ont été observés dans la parcelle isolée des flux géniques et 20 bananiers au stade floraison dans une zone non traitée proche de la parcelle entourée de bananiers non traités et soumise à de forts flux géniques.

Rang de feuilles	Nombre de lésions* dans la parcelle isolée des flux de gènes	Nombre de lésions dans la parcelle entourée de bananiers non traités
3 <sup>e</sup> feuille	6	69
4 <sup>e</sup> feuille	28	1005
5 <sup>e</sup> feuille	88	1796
Total	122	2870

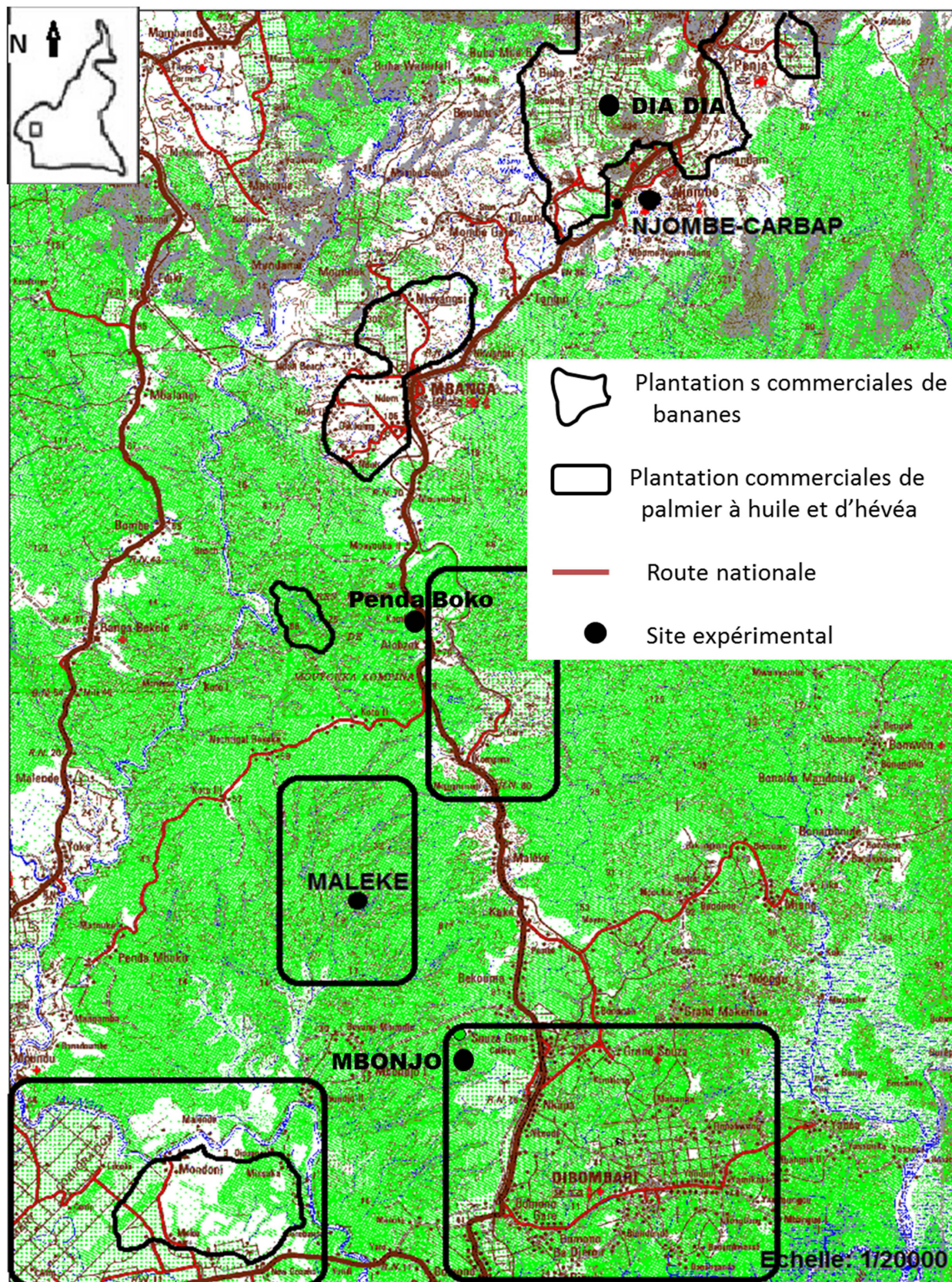
\*lésions de jeunes stades (1 à 4) de la maladie selon l'échelle de Fouré (1984), excluant le stade 6 de la nécrose

Tableau 2. Estimation d'un coefficient de sélection pour la résistance aux fongicides QoI dans deux dispositifs expérimentaux au champ.

	Nombre d'individus	Nombre de cycles de reproduction conidienne pour atteindre 90% de résistants	$s^a$	Intervalle de confiance
Parcelle isolée de flux de gènes	2680	9	0,7546	[0,7238 ; 0,7890]
Parcelle entourée de bananiers non traités	1320	20	0,4228	[0,4130 ; 0,4340]

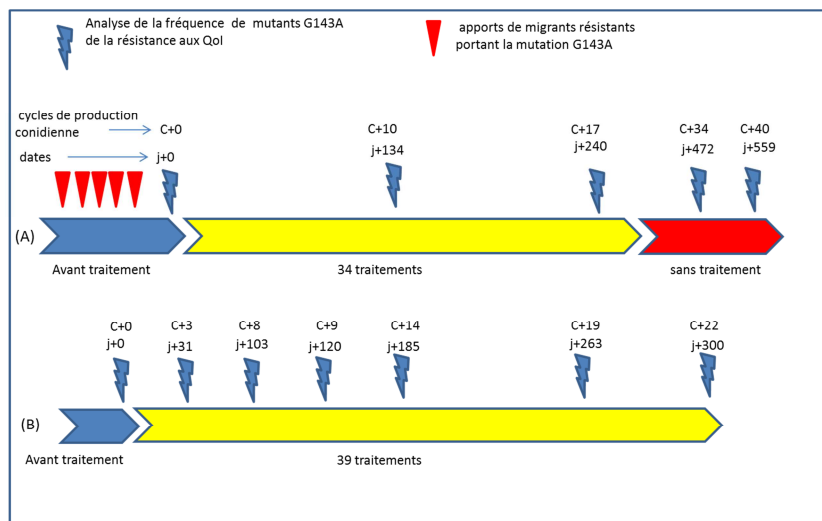
a. Coefficient de selection



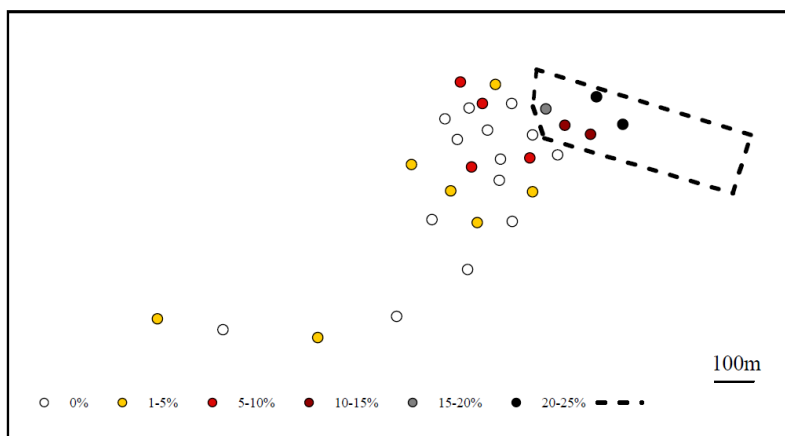


**Fig. 1.** La localisation des parcelles expérimentales respectivement dans des zones commerciales de palmier à huile et d'hévéa et dans des zones commerciales de bananes

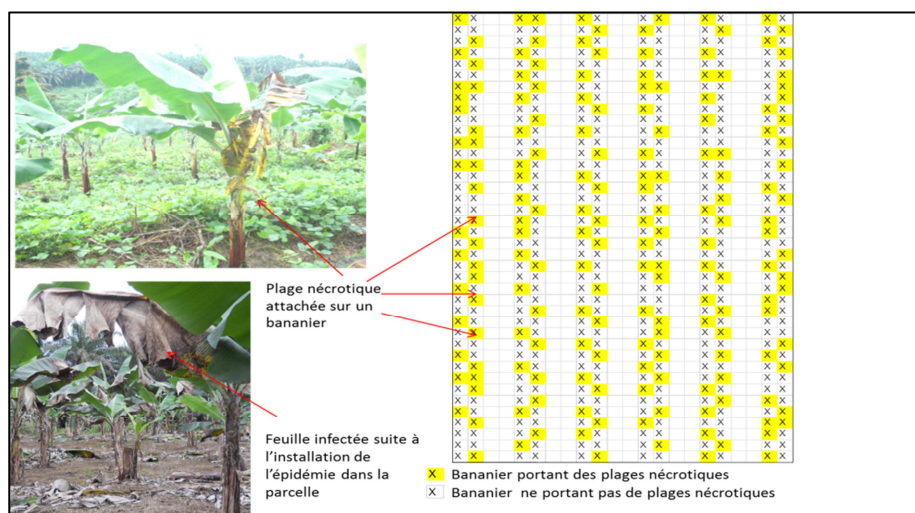




**Fig. 2.** récapitulatif de la séquence des opérations expérimentales dans les parcelles soumises aux traitements fongicides dans la parcelle (A) isolée de bananiers non traités, (B) entourée de bananiers non traités.



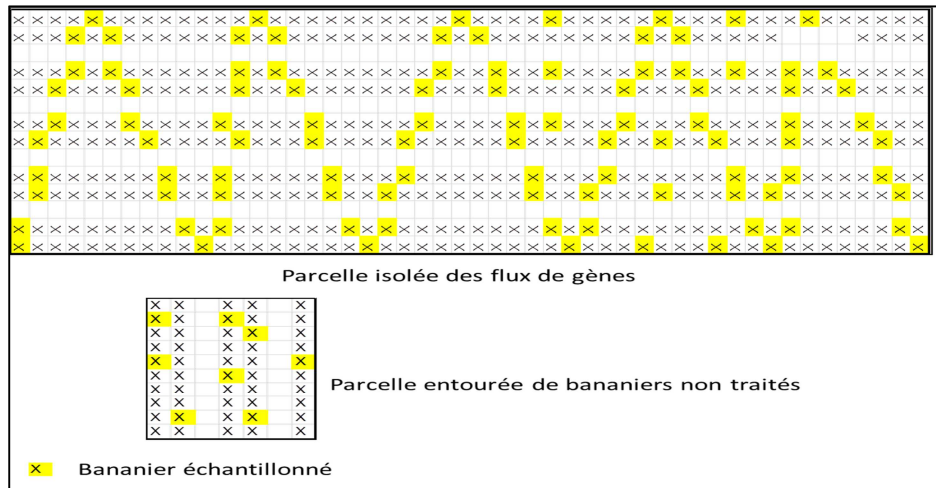
**Fig. 3.** Pourcentage de la mutation G143A conférant la résistance aux QoI dans la zone de Lala (Source: Rieux *et al.*, 2013)



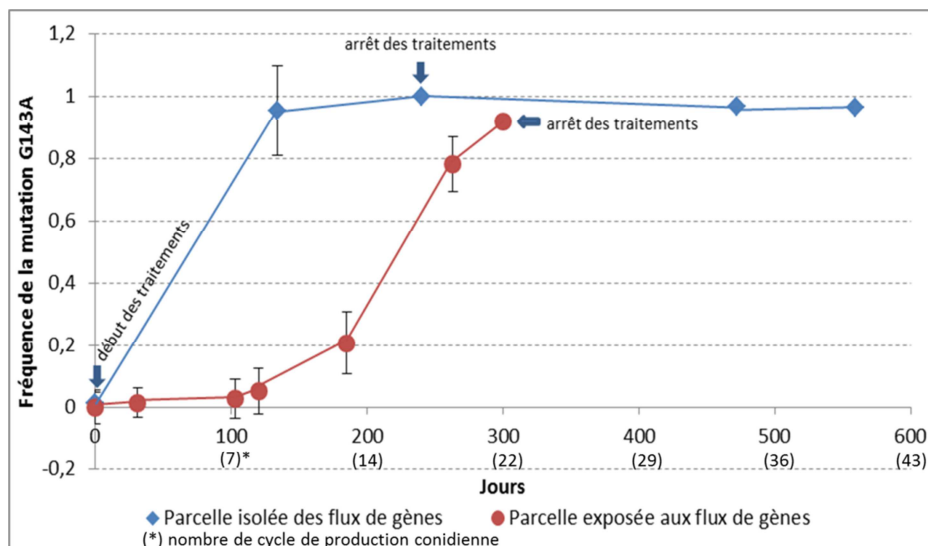
**Fig. 4.** Installation d'une épidémie dans le dispositif isolé de flux de gènes



**Fig.5.** Application des traitements fongicides au pulvérisateur



**Fig. 6.** Position des bananiers échantillonnés pour les analyses de la fréquence de la mutation G143A dans deux dispositifs expérimentaux



**Fig. 7.** Evolution du pourcentage de la mutation G143A au cours du temps dans la parcelle isolée de flux de gènes et dans la parcelle exposée aux flux de gènes. Les barres verticales représentent les écart-types



### III- 2 : Evolution du polymorphisme sur le gène *cyp51* associé à la résistance au DMI chez *Mycosphaerella fijiensis* dans des populations traitées au champ

#### 1- *Justificatif de l'étude*

Nous avons évalué l'effet de la sélection dans le cas particulier de la résistance disruptive sur un gène majeur pour la résistance aux QoI. Dans cette étude on s'intéresse maintenant à l'effet de la sélection dans le cas particulier de la sélection directionnelle pour la résistance quantitative polygénique appliquée à la résistance aux DMI. Dans ce mode de résistance, plusieurs mécanismes génétiques de la résistance sont impliqués et leurs combinaisons confèrent des niveaux graduels de la résistance (Leroux *et al.*, 2007, Anderson *et al.*, 2005). Il est alors impossible de suivre une mutation à un locus particulier pour inférer un coefficient de sélection comme dans le cas de la résistance aux QoI (Ennos and Mc Connell, 1991). Pour la résistance polygénique, l'évaluation repose sur la mesure d'un trait quantitatif au cours du temps pour inférer un paramètre de sélection (Broodie III *et al.*, 1993, Barton *et al.*, 2007). Nous nous sommes intéressés à la mesure d'un gradient de sélection à partir de la mesure de l'évolution d'un trait quantitatif (CI50 = concentration de fongicide qui inhibe 50% de la croissance du tube germinatif) en fonction du temps, mais nous n'avons pas encore obtenu tous les résultats des analyses en fin rédaction de cette thèse. En parallèle nous nous sommes intéressés aux études génétiques de la résistance aux DMI. L'objectif de la présente étude est d'abord d'estimer un gradient de sélection à partir de la mesure de la CI50 puis d'identifier les différentes altérations sur gène *cyp51* sous l'effet de la sélection et ensuite d'estimer à partir de ces altérations un coefficient de sélection dans une population de *M. fijiensis* soumise à des traitements fongicides continus. Pour cela nous avons séquencé tout le gène *cyp51* pour rechercher les mutations insertions et délétions susceptibles d'être associées à la résistance aux DMI chez *M. fijiensis* (confère 2.3 introduction générale). Nous avons ensuite comparé la répartition de ces mutations dans une population traitée en continu au propiconazole par rapport à une autre population de référence non traitée.

#### 2- Matériels et méthodes

##### 2.1- Présentation générale de l'expérimentation

Cette expérimentation a été conçue pour mesurer un coefficient de sélection au champ pour la résistance au propiconazole, un fongicide appartenant au groupe des DMI. Pour cela, nous avons d'abord séquencé le gène *cyp51* dans une population soumise à l'effet continu de la sélection pour repérer les différentes altérations du gène et ensuite nous avons cherché à caractériser l'évolution des différents haplotypes majoritaires afin d'éventuellement d'utiliser cette évolution pour calculer un coefficient de sélection. Dans le dispositif expérimental, une parcelle de bananiers a été installée dans un environnement où les flux de gènes sont limités. Avant les traitements, une épidémie a été générée

pour introduire un fond de résistance dans la population. Les bananiers ont été traités intensivement au propiconazole à intervalle régulier pour provoquer une augmentation des altérations sur le gène *gyp51*.

## *2.2- Conditions initiales sur la parcelle expérimentale avant l'application des traitements fongicides*

### *2.2.1- Description de la parcelle expérimentale*

La parcelle de bananiers a été mise en place en mai 2009 sur le site de Mbonjo localisé en plein milieu d'une vaste zone de culture de palmier à huile dans le sud-ouest du Cameroun (5°64'N ; 4°68'E) (Fig. 1 de la partie III.1 chapitre 2). Cet endroit a été choisi pour plusieurs raisons : (1) ces vastes étendues de palmier à huile fournissent des zones sans bananiers hôtes de *M. fijiensis* dans un rayon de 7 km permettant de limiter les sources potentielles de contaminations extérieures ; (2) les zones commerciales de production de bananes sont éloignées à plus de 50 km, excluant la possibilité d'introduction de mutations par les flux de gènes extérieurs. Une parcelle de 555 bananiers (cultivar Grande naine du sous-groupe Cavendish) a été plantée avec des bulbes de bananier à rejet attendant provenant des plantations commerciales. Ce matériel végétal a été transporté sans aucune feuille pour éviter l'introduction de souches résistantes sur le site. Un fond de résistance a été installé dans cette parcelle afin d'accélérer le processus de sélection (Fig. 1). Pour cela nous avons tout d'abord identifié une source d'inoculum abondant dans une parcelle de plantain non traité située au contact d'une parcelle commerciale (Mbomé) dans laquelle une forte dérive de sensibilité aux DMI avait été observée. Les plages nécrotiques prélevées sur ces plantains non traités contiennent des ascospores en abondance qui dispersent par le vent (Rieux *et al.*, 2014). Pour installer une nouvelle épidémie, nous avons prélevé et introduit, cinq fois consécutivement à intervalle de quatre semaines 520 feuilles portant de larges plages nécrotiques. Pour faciliter l'installation de l'épidémie, les bananiers de la parcelle de Mbonjo ont été effeuillés (ablation de feuille) en continu pour éliminer les plages nécrotiques et donc toutes les sources d'ascospores. Nous avons par la suite laissé l'épidémie s'installer pendant 485 jours. Avant le démarrage des traitements nous avons pratiqué des ablations sévères de plages nécrotiques pour éliminer toute source d'ascospores et favoriser uniquement le développement de conidies sur des jeunes lésions (Fig. 2).

### *2.2.3- Quantification initiale de la taille de la population avant l'initiation des épidémies*

La taille de la population fongique avant l'installation de l'épidémie a été quantifiée en comptant les jeunes lésions de stade 1 à 4 sur l'échelle de Fouré (Fouré, 1988). Les comptages ont été réalisés sur les 5 premières feuilles de 10 bananiers au stade de croissance de 8 feuilles choisis aléatoirement. Ce comptage a permis de se faire une idée de l'intensité des flux de gènes sur cette parcelle isolée.

## *2.3- Application de la pression de sélection par les fongicides*

Le propiconazole (fongicide du groupe des DMI) a été utilisé dans cette étude. Les bananiers ont été traités de manière intensive à intervalle de 7 à 10 j avec du Tilt 250 EC (250 g/L de propiconazole). Les

applications étaient particulièrement dirigées sur les premières feuilles en les aspergeant de bouillie fongicide à l'aide d'un pulvérisateur à dos (Fig. 3). Au total 41 traitements ont été appliqués en 440 j de septembre 2011 à novembre 2012 avec le Tilt 250 EC à la dose de 100 g de propiconazole par hectare dans 20 L d'eau additionné d'un adjuvant Triton X 100 à la dose de 1‰.

#### 2.4- Etude de la variabilité moléculaire du gène *cyp51*

##### 2.4.1- Echantillonnage

Pour chaque date de prélèvement, des portions de feuilles fraîches découpées sur la 5<sup>e</sup> feuille portant des jeunes lésions (stade 2-3 selon l'échelle de Fouré) ont été collectés sur 30 bananiers sélectionnés aléatoirement. Tous les prélèvements ont toujours été réalisés sur les mêmes bananiers (Fig. 4). Les prélèvements ont été réalisés en septembre 2011 avant les traitements (j+0), en août 2012 (j+334), en novembre 2012 (j+423) (Tableau 1).

Une lésion par bananier a été utilisée pour les isollements du champignon, soit 30 lésions par date de prélèvement permettant de constituer un lot de 30 souches par date de prélèvement. La mise en culture de conidies sur milieu solide sans fongicide à partir de lésions individuelles a été réalisée suivant la méthode décrite par Ngando *et al.* (2014). Une seule conidie par lésion a été clonée à la loupe binoculaire et mise en culture sur milieu solide PDA (39 g/L) amendé de 100 µg/L de chloramphénicol pendant 10 j à 25 °C avec 12 h de photopériode. Un fragment de mycélium de chaque isolat a été conservé en collection dans du glycérol (15%) à – 80°C. Au total trois populations d'isolats ont été réunies : P<sub>0</sub> = 24 isolats à j+0, P<sub>1</sub> = 22 isolats à j+334 et P<sub>2</sub> = 25 isolats à j+423. En plus de ceux-ci une autre population P<sub>prt</sub> de 25 isolats provenant d'une zone non traitée de référence a été associée au panel de populations réunies pour l'étude (Tableau 1).

##### 2.4.3- Séquençage du gène *cyp51*

Une nouvelle culture des isolats maintenus en collection a été initiée pour la production de mycélium sur milieu solide V8 300 (jus V8 300 mL, CaCO<sub>3</sub> 3 g, agar 20 g et eau distillée 700 mL) à 25 °C pendant 10 j. L'extraction de l'ADN sur chaque isolat a été réalisée à partir de la méthode décrite par Halkett *et al.* (2010).

L'objectif était de séquencer pour l'ensemble des isolats 3989 pb incluant le gène *cyp51* chez *M. fijiensis*. A cet effet, deux fragments chevauchants ont été amplifiés à partir des extraits d'ADN totaux respectivement de 2284 pb et 1911 pb (Fig. 5). Les couples d'amorces Cyp1-CypIn2R pour le premier fragment et CypIn1F-Cyp13 pour le deuxième, utilisés pour les amplifications PCR, ont été définis à partir de la séquence de référence disponible sur le site JGI *Mycosphaerella fijiensis* v2.0 (Mycofic2) ([http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/browserLoad?db=Mycfi2&position=scaffold\\_1:285001-385000](http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/browserLoad?db=Mycfi2&position=scaffold_1:285001-385000)).

Les amorces Cyp1 (dessiné par Anne-Sophie Walker, *communication personnelle*) et Cyp13 ont été dessinées aux extrémités de la séquence de référence, les amorces CypIn1F et CypIn2R sur une

séquence intronique. Les amorces internes utilisées pour le séquençage de chacun des deux amplifiats ont été dessinées de manière à obtenir des séquences exploitables elles aussi chevauchantes pour les brins sens et anti-sens (Fig. 5). Pour le fragment Cyp1-CypIn2R, les amorces de séquençage utilisées en plus des amorces externes sont seqCyp1 pour le brin sens et seqCyp3 pour le brin anti-sens. Pour le fragment CypIn1F-Cyp13, les amorces de séquençage sont seqCyp4 pour le brin sens, SeqCyp5 et SeqCyp6 pour le brin anti-sens (Tableau 2). L'ensemble des amorces a été dessiné à l'aide du programme Primer. EXE avec comme critères communs une température de fusion ou  $T_m$  comprise entre 60 et 62 °C et un pourcentage en nucléotides GC compris entre 40-60%. Les conditions d'hybridation ont été optimisées en utilisant un gradient de température. Les PCR ont été réalisées à l'aide d'un thermocycleur (Biometra professional Thermocycler), dans le mélange réactionnel suivant : 7 µL de tampon 5X Colorless ; 3,5 µL de dNTP à 2 mM chaque ; 1,4 µL des amorces forward et reverse à 10 µM chaque ; 0,175 µL de GoTaq DNA Polymérase (Promega M3175) ; 1,6 µL d'ADN total à 50 ng/µL (dosage Nanodrop) QSP 35 µL H<sub>2</sub>O grade BM. La réaction d'amplification a été conduite dans les conditions suivantes : dénaturation initiale de 3 min à 94°C, suivi par 35 cycles d'amplification 30s à 94°C, 30s à 58°C, 2 min à 72°C et d'une élongation finale de 10 min à 72°C. La qualité des amplifications a été validée, avant séquençage, par un dépôt des produits PCR sur gel d'agarose 0,8% dans du tampon TAE 0,5X, migration 100V pendant 25 min puis coloré au bromure d'éthidium. Le séquençage a été réalisé à l'aide du séquenceur capillaire ABI PRISM 3730xl par la société commerciale Beckman Coulter Genomics. Les corrections et alignements de séquence ont été réalisés à l'aide du logiciel CodonCode Aligner.

## 2.5- Analyses génétiques

### 2.5.1- Alignement des séquences et recherche du polymorphisme

Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel CodonCode aligner 4.2.3. Les alignements ont été réalisés par rapport à la séquence de référence JGI *Mycosphaerella fijiensis* v2.0 (Mycofic2) et le polymorphisme a été détecté sur la séquence consensus en comparant toutes les séquences d'individus. La mutation à un locus particulier a été identifiée en observant un nucléotide différent de celui de la séquence de référence. Une insertion a été identifiée en observant un ou plusieurs nucléotides supplémentaires qui n'existent pas dans la séquence de référence et une délétion en observant l'absence d'un ou plusieurs nucléotides qui sont présents dans la séquence de référence.

### 2.5.2- Analyse de la diversité génotypique

La diversité génotypique a été analysée pour voir si on pouvait pour suivre l'évolution d'un haplotype résistant au cours du temps dans le but de calculer un coefficient de sélection sur la base du modèle de Milgroom *et al.* (1989). Les différents haplotypes ont été identifiés et leur relations a été inférée à partir du programme NETWORK 4.6.1.2 (Bandelt *et al.*, 1999 ; [www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)). Ce programme a permis de faire une représentation du réseau d'haplotypes en intégrant d'abord toutes les populations

en même temps pour identifier les différents haplotypes et avoir un aperçu de leurs fréquences, puis d'autres représentations de réseaux d'haplotypes sur les populations individuelles date par date pour évaluer en détail la fréquence des différents haplotypes, la taille des cercles indiquant la fréquence des haplotypes.

L'indice de diversité génotypique noté  $G$  est la probabilité que deux individus pris au hasard aient des génotypes différents. Pour cela, la diversité génotypique a été calculée à l'aide du programme Multilocus 1.3 (Agapow and Burt 2003) sur toutes les populations en même temps puis par population individuelle. La différenciation génotypique a été estimée par un test exact de Fisher (test  $G$ ) à l'aide du programme Genepop 4.2 pour comparer les distributions des haplotypes en considérant toutes les populations puis par populations prises deux à deux.

#### 2.5.4- Analyse du déséquilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison multilocus a été estimé à l'aide du paramètre  $rd$  et du programme Multilocus 1.3 (Agapow and Burt, 2001). Ce paramètre est basé sur le nombre de locus par lesquels chaque paire d'individus diffère. Sa valeur varie entre 0 (équilibre gamétique) et 1 (déséquilibre maximal). La valeur de  $rd$  est testée différente de 0 sur la base de 1000 randomisations. Le déséquilibre de liaison a été testé pour toutes les paires de locus dans chacune des populations par un test exact à l'aide du programme Genepop 4.2. Les résultats ont été combinés sur l'ensemble des populations par la méthode de Fisher et le seuil de significativité a été corrigé par la méthode de Bonferroni.

### 3- Résultats

#### 3.1- Comparaison des séquences du gène *cyp51* dans les différentes populations échantillonnées

Deux fragments d'ADN ont été amplifiés avec plusieurs amorces pour obtenir la séquence finale de 3989 pb du gène *cyp51* (accession JGI *Mycosphaerella fijiensis* v2.0 Mycofic2). Les ADN de 94 isolats composés d'une population de référence non traitée (Pnrt), et d'une population échantillonnée à trois dates différentes  $P_0$  (j+0),  $P_1$  (j+334) et  $P_2$  (j+423) ont été séquencés. La comparaison des séquences nucléotidiques de différents isolats, a révélé plusieurs mutations et insertions dans les zones codantes et non codantes. Le gène *cyp51* (Fig. 2) est composé d'une région en amont (présumée promotrice) allant du nucléotide 1 à 1710, de trois exons [(exon 1 : 1711 à 2154) (exon 2 : 2202 à 2216) (exon 3 : 2304 à 3474)] séparés par deux introns et d'une région en aval du gène (Cañas-Gutiérrez *et al.*, 2009).

##### 3.1.1- Les altérations dans la zone codante

Dans la zone codante, on a retrouvé 4 mutations la cytosine (C) par la glycine (G) à la position 2843, alanine (A) par thymine (T) à la position 3284, T par A à la position 3290 et T par G ou A à la position 3292. Ces mutations ponctuelles entraînent respectivement des changements d'acides aminés à différentes positions de la protéine A313G, D460V, G462A, Y463N/Y463R (Fig. 6). La mutation

A313G a été la plus fréquente sur le gène et partout où elle a été présente elle a toujours été associée avec une autre mutation dans la zone codante (Fig. 6). Sa fréquence était élevée dans  $P_0 = 0,75$  et cette mutation était présente chez tous les individus dans les populations  $P_1$  et  $P_2$ . La fréquence de la mutation D460V a été plus faible dans  $P_0$  et a augmenté dans  $P_1$  et  $P_2$ . Les deux autres mutations ont été plus rares.

### 3.1.2- Les altérations dans la zone promotrice du gène

Dans la région située en amont, neuf mutations ponctuelles aboutissant à un changement d'un nucléotide par un autre ont été retrouvées entre 1642 et 1674 (Fig. 6) : le remplacement de C par T au niveau des nucléotides 1642, 1645, 1671 et 1674 ; T par C à la position 1643 ; C par G à la position 1648 ; G par A à la position 1651 ; C par A à la position 1672 et A par G à la position 1673. La fréquence de la plupart de ces mutations était déjà élevée dans la population initiale ( $P_0 = 0,67$ ) qui avait été installée dans la parcelle avant les traitements et elle a encore augmenté durant la période d'application des traitements aux deux échantillonnages suivants ( $P_1 = 1$  et  $P_2 = 0,92$ ). Dans cette même région, il y a eu 10 insertions de 1 à 12 nucléotides (Fig. 6) : pour les insertions de 1 pb, C ou A à 1622, G ou A à 1623, T à 1640 et 1656 et A à 1646 ; les insertions de 3 pb AAC à 1675 et 4 pb GCAG à 1652 ; une insertion de 7 pb TGT'TAAA à 1633 ; une insertion de 9 pb TACGATAGA à 1624 ; une insertion de 12 pb TAAATCTCGTAC à 1657. La fréquence de ces insertions dans  $P_0$  a varié entre 0 à 0,67 et dans la plupart des cas elle a augmenté avec les traitements dans  $P_1$  et  $P_2$ . On a également retrouvé des cas rares de délétions des nucléotides à 1669, 1670 et 1671 chez quelques individus.

### 3.2- Analyse de la diversité génotypique du gène *cyp51*

Toutes les mutations, insertions et délétions sont réparties entre 13 haplotypes (Fig. 6). La répartition de ces haplotypes au sein des populations analysées a révélé la présence d'un seul haplotype dans la population de référence non traitée (Prnt), 9 dans la  $P_0$ , 4 dans la population  $P_1$  et 6 dans la population  $P_2$  (Tableau 3). Les analyses par des réseaux d'haplotypes ont montré deux grands groupes d'haplotypes (Fig. 7) :

- (i) un premier groupe qui représente surtout les populations avant les traitements (Prnt et  $P_0$ ) est majoritairement composé de l'haplotype 1 et des haplotypes 2, 3, 4, 5 et 12 portant tous des mutations dans la zone codante mais pas d'insertions dans la zone non codante (sauf l'haplotype 12 qui comporte des insertions dans cette zone) ;
- (ii) Un deuxième groupe constitué de 7 nouveaux haplotypes caractérisés par de nouvelles mutations et surtout des insertions dans la région promotrice. Certains de ces haplotypes semblent augmenter en fréquence et plus particulièrement l'haplotype 7 (Fig. 7) (Tableau 3). Cet haplotype serait devenu l'haplotype majoritaire dans les populations  $P_0$ ,  $P_1$  et  $P_2$  (Fig. 8) (Tableau 3).

L'estimation de la diversité génotypique montre qu'elle était très faible dans P<sub>nrt</sub>, et forte avant les traitements dans la population initiale P<sub>0</sub> (0,724), puis elle a chuté d'environ 50% dans P<sub>1</sub> (0,347) et de 35% dans P<sub>2</sub> (Tableau 4). La différenciation génotypique testée à l'aide du test exact de Fisher sur la distribution des haplotypes, est significative en considérant l'ensemble des populations P<sub>0</sub>, P<sub>1</sub> et P<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ) et non entre paires de populations (Tableau 5).

### 3.4- Analyse du déséquilibre de liaison

Les différentes populations analysées ont respectivement montré un déséquilibre de liaison multilocus très significatif ( $p < 0,001$ ). Environ 30% (x/y) des paires de locus polymorphes présente un déséquilibre de liaison significatif sur l'ensemble des populations après correction de Bonferroni. Ces résultats montrent qu'il existe globalement des liaisons entre les locus au sein de chaque population

## 4- Discussion

Les résultats ont montré un important polymorphisme sur le gène *cyp51* chez *M. fijiensis*. Nous avons trouvé du polymorphisme pour 25 locus sur le gène *cyp51*. Ce polymorphisme concerne aussi bien la zone codante que la zone non codante promotrice. Dans la zone non codante, nous avons trouvé des insertions à 10 locus différents avec des fragments nucléotidiques de taille différente, pour un total de 40 pb. La fréquence de ces insertions dans les populations augmente au cours du temps. Ce résultat est cohérent avec ceux de Arango *et al.* (2010) et Chong *et al.* (2011) qui avaient trouvé des insertions au total de 39 à 97 pb chez les souches résistantes aux DMI chez *M. fijiensis*. Chez *M. graminicola*, Cools *et al.* (2012) avaient trouvé une insertion de 120 pb en un seul bloc sur le gène *cyp51*. Le nombre d'insertions nucléotidiques sur le gène *cyp51* associé à la résistance est variable chez d'autres espèces : 553 pb chez *Venturia inaequalis* (Schnabel and Jones, 2001), 126 pb chez *Penicillium digitatum* (Sánchez-Torres and Tuset, 2011; Hamamoto *et al.*, 2000 ; Nakaune *et al.*, 2002), 65 pb chez *Monilia fructicola* (Luo and Schnabel, 2008), 150 ou 232 pb chez *Pyrenopeziza brassicae* (Carter *et al.*, 2014). Par ailleurs, généralement dans la région promotrice du gène, des mutations associées à la résistance ne sont pas décrites alors que nous avons trouvé 9 mutations qui augmentent pourtant toutes en fréquence au cours du temps (Tableau 3), ce qui suggère qu'elles seraient probablement associées à la résistance.

Dans la zone codante, nous avons trouvé les principales mutations décrites chez *M. fijiensis* et chez *M. graminicola* notamment la A313G, la G462A et la Y463N/R (Arango *et al.*, 2010 ; Chong *et al.*, 2011 ; Canas-Gutierrez *et al.*, 2009 ; Cools *et al.*, 2012 ; Leroux and Walker 2011) (Fig. 9). Nous avons trouvé en plus une nouvelle mutation D460V qui n'avait pas été décrite chez ce pathogène. Chez *M. graminicola*, la mutation au codon 460 correspond plutôt à un changement G460D. Les résultats montrent que certaines de ces mutations apparaissent toujours ensemble, notamment la mutation A313G qui n'apparaît jamais seule, mais presque toujours associée avec une autre mutation de la zone codante et également à toutes les autres altérations survenues sur le gène. Ce résultat corrobore

les observations de Canas-Gutierrez *et al.* (2009) sur l'association des mutations A313G avec Y463, Y461 et Y136 chez *M. fijiensis*. D'autres auteurs ont montré que les mutations Y459-Y461 sont liées à celles de la région 428-493 chez *M. graminicola* (Cools *et al.* 2012).

Nous avons mis en évidence un important déséquilibre de liaison globalement entre les différents sites polymorphes. Ceci suggère que certaines combinaisons de mutations et insertions formant des haplotypes pourraient éventuellement servir à mesurer un coefficient de sélection en suivant l'augmentation de leur fréquence au cours du temps et en considérant un haplotype comme un allèle afin employer le modèle de Milgroom *et al.*, (1989).

Les résultats ont montré que la diversité génétique diminue au cours du temps en fonction des traitements fongicides, ce qui tend à montrer soit un effet de la sélection soit un effet de la dérive génétique. Cette diversité était importante (0,724) dans la population initiale avant les traitements, parce que d'une part les épidémies ont été initiées dans la parcelle à partir d'un inoculum hétérogène de sources diverses et d'autre part la reproduction sexuée était très importante au cours de l'installation de cette épidémie. Par la suite de sévères ablations de feuilles infectées effectuées avant les traitements ont fortement réduits la taille des populations. Les traitements ont alors progressivement éliminé les individus de l'haplotype 1 supposés sensibles, et les haplotypes rares 2, 3, 4, 5 et 12 ont probablement disparu sous l'effet de la dérive génétique. Au cours de la période durant laquelle les traitements ont été appliqués, de nouveaux haplotypes sont apparus et l'haplotype 7 est devenu rapidement majoritaire. Toutefois, compte tenu de la faible taille des populations analysées, nous n'avons observé qu'une variation faiblement significative de répartition de la fréquence des haplotypes en considérant l'ensemble des populations et pas de différence significative entre les populations prises deux par deux. La différence entre  $P_0$  et  $P_2$  sont à la limite du seuil significatif et on suppose qu'avec une taille de population plus grande les différences auraient été plus significatives. Dans ces conditions, l'haplotype 7 ne pas être utilisé pour estimer un coefficient de sélection à partir du modèle de Migroom *et al.* (1989). Par ailleurs, la population initiale  $P_0$  contenait déjà beaucoup d'altérations sur le gène *cyp51* et était déjà trop différente de la Prnt, ce qui a compliqué la mesure d'un coefficient de sélection, car le niveau de résistance était probablement déjà très élevé. Les analyses de la CI50 en cours permettront de relier les différents génotypes avec les différentes altérations du gène et de confirmer cette hypothèse. Les résultats de ces analyses permettront également de mesurer un coefficient de sélection en fonction de la valeur moyenne de la CI50 au cours du temps.

## Références bibliographiques

Agapow, P.-M., Burt, A., 2001. Indices of multilocus linkage disequilibrium. Molecular Ecology Notes 1, 101-102.



- Cañas-Gutiérrez, G.P., Angarita-Velásquez, M.J., Restrepo-Flórez, J.M., Rodríguez, P., Moreno, C.X., Arango, R., 2009. Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science* 65, 892-899.
- Carter, H.E., Fraaije, B.A., West, J.S., Kelly, S.L., Mehl, A., Shaw, M.W., Cools, H.J., 2014. Alterations in the predicted regulatory and coding regions of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (CYP51) confer decreased azole sensitivity in the oilseed rape pathogen *Pyrenopeziza brassicae*. *Molecular plant pathology* 15, 513-522.
- Chong, H.S., Dagg, R., Malik, R., Chen, S., Carter, D., 2010. In vitro susceptibility of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. *Journal of clinical microbiology* 48, 4115-4120.
- Cools, H.J., Bayon, C., Atkins, S., Lucas, J.A., Fraaije, B.A., 2012. Overexpression of the sterol 14 $\alpha$ -demethylase gene (MgCYP51) in *Mycosphaerella graminicola* isolates confers a novel azole fungicide sensitivity phenotype. *Pest Management Science* 68, 1034-1040.
- Cools, H., Parker, J., Kelly, D., Lucas, J., Fraaije, B., Kelly, S., 2010. Heterologous expression of mutated eburiol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) proteins of *Mycosphaerella graminicola* to assess effects on azole fungicide sensitivity and intrinsic protein function. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2866-2872.
- Hamamoto, H., Hasegawa, K., Nakaune, R., Lee, Y.J., Makizumi, Y., Akutsu, K., Hibi, T., 2000. Tandem Repeat of a Transcriptional Enhancer Upstream of the Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase Gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3421-3426.
- de Lapeyre de Bellaire, L., Risede, J.-M., 2008. A laboratory method to evaluate *Pseudocercospora musae*'s sensitivity to fungicides. *Fruits* 63, 53-56.
- Leroux, P., Walker, A.-S., 2010. Les fongicides affectant les processus respiratoires Épisode 1-Modes d'action et phénomènes de résistance chez les anciennes substances (multisites et unisites affectant la biodisponibilité de l'ATP) et les nouvelles de type SDHI. *Phytoma-La Défense des Végétaux*, 8-11.
- Leroux, P., Albertini, C., Gautier, A., Gredt, M., Walker, A.S., 2007. Mutations in the CYP51 gene correlated with changes in sensitivity to sterol 14 $\alpha$  demethylation inhibitors in the field isolates of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Management Science* 63, 688-698.
- Luo, C.-X., Schnabel, G., 2008. The cytochrome P450 lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase gene is a demethylation inhibitor fungicide resistance determinant in *Monilinia fructicola* field isolates from Georgia. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 359-366.
- Fouré, E., 1988. Stratégies de lutte contre la cercosporiose noire des bananiers et plantains provoquée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. L'avertissement biologique au Cameroun. Evaluation des possibilités d'évaluation. *Fruits* 43, 269-274.
- Halkett, F., Coste, D., Rivas Platero, G.G., Zapater, M.F., Abadie, C., Carlier, J., 2010. Genetic discontinuities and disequilibria in recently established populations of the plant pathogenic fungus *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology* 19, 3909-3923.
- Milgroom, M.G., Levin, S.A., Fry, W.E., 1989. Population genetics theory and fungicide resistance. *Plant disease epidemiology* 2, 340-367.

- Nakaune, R., Hamamoto, H., Imada, J., Akutsu, K., Hibi, T., 2002. A novel ABC transporter gene, PMR5, is involved in multidrug resistance in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Molecular Genetics and Genomics* 267, 179-185.
- Ngando, J.E., Rieux, A., Nguidjo, O., Pignolet, L., Dubois, C., Mehl, A., Zapater, M.F., Carlier, J., de Lapeyre de Bellaire, L., 2014. A novel and more reliable bioassay to monitor fungicide sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science* 71, 441-451.
- Rieux, A., Soubeyrand, S., Bonnot, F., Klein, E.K., Ngando, J.E., Mehl, A., Ravigne, V., Carlier, J., de Bellaire, L.d.L., 2014. Long-Distance Wind-Dispersal of Spores in a Fungal Plant Pathogen: Estimation of Anisotropic Dispersal Kernels from an Extensive Field Experiment. *PloS one* 9, e103225.
- Sánchez-Torres, P., Tuset, J.J., 2011. Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus. *Postharvest Biology and Technology* 59, 159-165.
- Schnabel, G., Jones, A.L., 2001. The 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistant to myclobutanil. *Phytopathology* 91, 102-110.

Tableau 1. Nombre d'isolats utilisés lors de l'extraction et l'amplification de l'ADN du gène *cyp51* chez *M. fijiensis*

Nom des échantillons	Date de prélèvements	Nombre d'isolats utilisés pour les extractions d'ADN	Nombre de traitements cumulés appliqués sur la population
Prnt	Février 2007	25	0
P <sub>0</sub>	Septembre 2011	24	0
P <sub>1</sub>	Aout 2012	21	29
P <sub>2</sub>	Novembre 2012	24	41

Prnt : Population de référence non traitée, P<sub>0</sub> : population sans traitement (j+0), P<sub>1</sub> : population à la date 1 (j+334), P<sub>2</sub> : population à la date 2 (j+423).

Tableau 2. Les différentes amorces utilisées pour le séquençage du gène *cyp51* chez *M. fijiensis*

Fragment	Brin	Amorces	Séquence amorce	Position de l'amorce sur le gène
Fragment 1 (2282 pb)	Brin sens	Cyp1	GGAGCGATAGAATGGGTTGA	18 pb
		SeqCyp1	GTTGAGGACTGCGATGTAGC	120 pb
		CypInR	GGCGCAGGTTAGCAAGTGT	2281 pb
	Brin anti-sens	SeqCyp3	CCTCGCAATTGATGAGAAGC	1511 pb
Fragment 2 (1911 pb)	Brin sens	CypIn1F	TGCGTGCACACAATAAGCTG	2155 pb
		SeqCyp4	GGAGATTGCGCACATGATGA	2750 pb
		Cyp13	GCGGAGTTCGGTACAAGAAGT	4046 pb
		SeqCyp5	GGAAGTCTACACAGCGATCA	2621 pb
		SeqCyp6	GGCGTACGTTAACTCCTTGA	2911 pb

Tableau 3. La répartition de la fréquence d'haplotypes au sein des populations

	Haplotypes												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Prnt	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P <sub>0</sub>	0,21	0,04	0,00	0,04	0,04	0,04	0,50	0,04	0,04	0,00	0,00	0,04	0,00
P <sub>1</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,81	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,05
P <sub>2</sub>	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,71	0,04	0,08	0,04	0,04	0,00	0,00

Prnt : Population de référence non traitée, P<sub>0</sub> : population sans traitement (j+0), P<sub>1</sub> : population à la date 1 (j+334), P<sub>2</sub> : population à la date 2 (j+423).

Tableau 4. Diversité génotypique sur le gène *cyp51* chez des populations de *M. fijiensis* basée sur l'analyse des mutations et insertions liés à la tolérance aux DMI

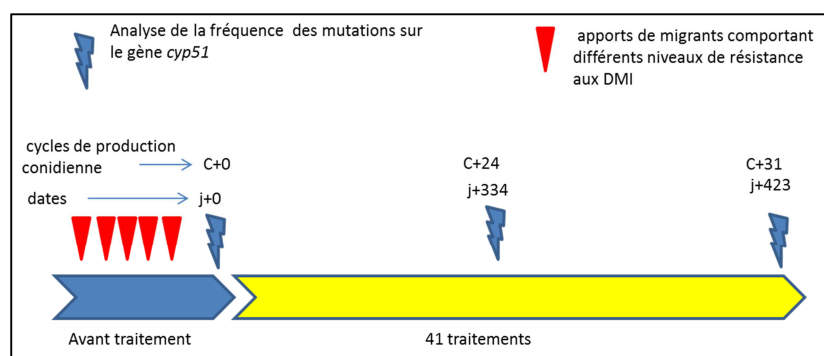
	NG/N	G	rd
Prnt	0,04	<0,00001	-
P <sub>0</sub>	0,375	0,724	0,443***
P <sub>1</sub>	0,190	0,347	0,551***
P <sub>2</sub>	0,250	0,500	0,391***
Populations zone traitée (P <sub>0</sub> , P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> )	0,188	0,549	0,399***
Population globale (P <sub>0</sub> , P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub> , Prnt)	0,138	0,661	0,466***

Prnt : Population de référence non traitée, Prnt : Population de référence non traitée,  $P_0$  : population sans traitement (j+0),  $P_1$  : population à la date 1 (j+334),  $P_2$  : population à la date 2 (j+423). \*p-value < 0,001. NG : nombre de génotypes. N : nombre d'individus.  $G$  : diversité génétique.  $rd$  : déséquilibre de liaison multilocus

Tableau 5 : comparaison des distributions des haplotypes au sein des différentes populations à l'aide du test exact de Fisher

	<i>p-value</i>
$P_0, P_1, P_2$	0,0327*
$P_0, P_1$	0,08543
$P_0, P_2$	0,05347
$P_1, P_2$	0,36315

\*p-value < 0,05 test significatif



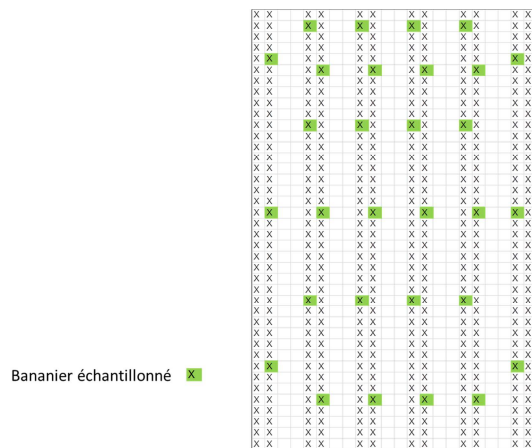
**Fig. 1.** Récapitulatif de la séquence des opérations expérimentales dans la parcelle soumise aux traitements de propiconazole et isolée de flux de gènes



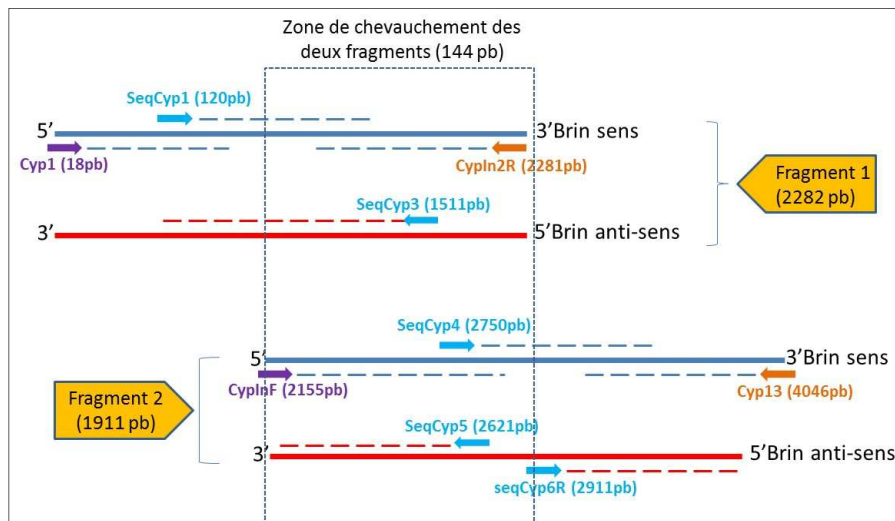
**Fig. 2.** Ablation sévère de feuilles infectées



**Fig. 3.** Préparation des bouillies fongicides et application sur les bananiers



**Fig. 4.** Position des bananiers échantillonnés pour les analyses de la fréquence de la mutation G143A dans deux dispositifs expérimentaux



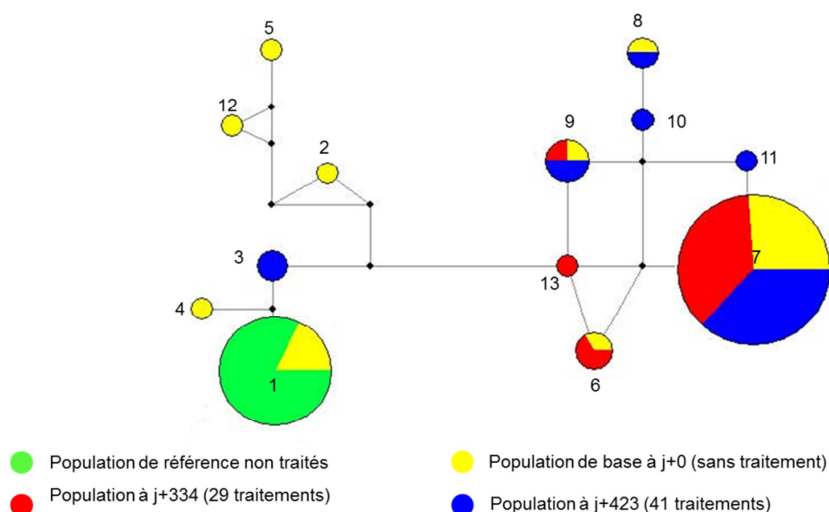
**Fig. 5.** Stratégie de séquençage du gène *cyp51*

N°nucléotide	1622	1623	1624	1633	1640	1642	1643	1645	1646	1648	1651	1652	1656	1657	1669	1670	1671	1672	1673	1674	1675	2843	3284	3290	3292
Seq référence	-	-	-	-	-	C	T	C	-	C	G	-	-	-	G	A	C	C	A	C	-	C	A	T	T
Seq altérée	C/A	G/A			T	T	C	T	A	G	A		T				T	A	G	T		G	T	A	G/A
<div>TACGATAGA TGTTAA  GCA TAAATCTCGTAC  AAC  A313G D460V G462A Y463/N/R</div>																									
Fréquences																									
Pnrt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P0	0,13	0,08	0,08	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0,67	0	0,67	0,58	0,04	0,04	0,67	0,67	0,67	0,125	0,042	0,75	0,58	0,08	0,08
P1	0,1	0,1	0,05	1	1	1	1	1	1	1	1	0,05	1	0,9	0	0	1	1	1	0,048	0	1	0,81	0	0,19
P2	0,21	0,17	0,17	0,83	0,83	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92	0	0,92	0,88	0,04	0,04	0,92	0,92	0,92	0,208	0	1	0,75	0,08	0,17

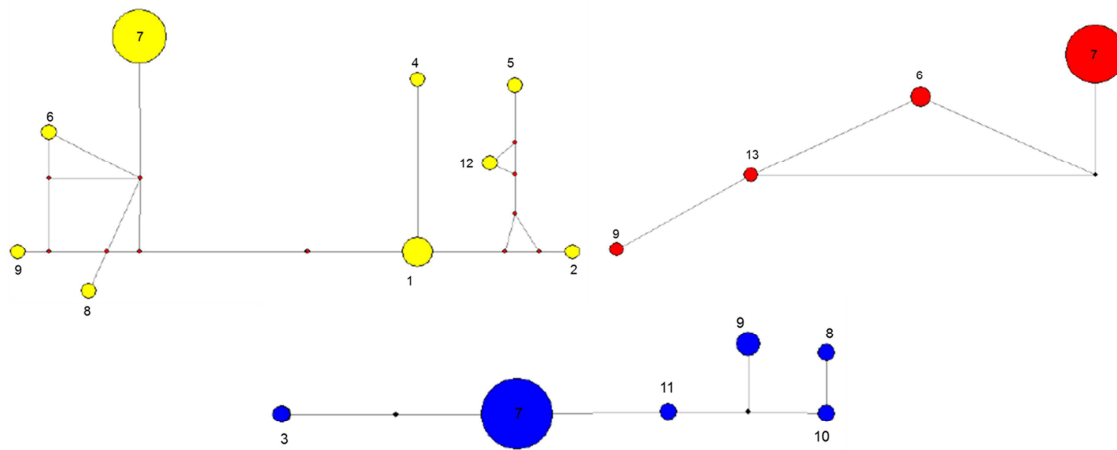
Zone non codante dans la région du promoteur    XXXX: Insertion    X: mutation    -- déletion    -- gap  
 Zone codante

P<sub>0</sub> : population sans traitement (j+0), P<sub>1</sub> : population à la date 1 (j+334), P<sub>2</sub> : population à la date 2 (j+423)

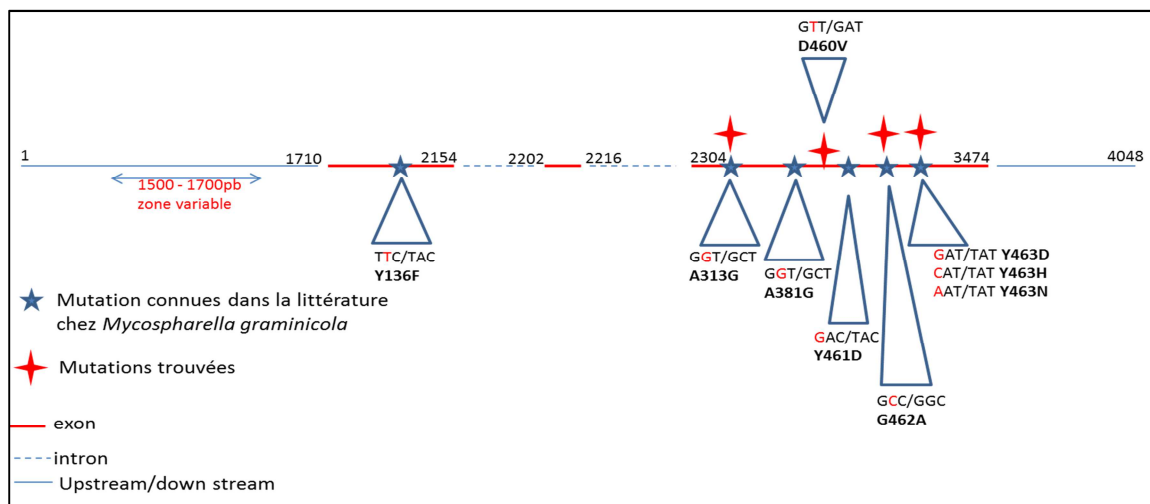
**Fig. 6.** Répartition des mutations, insertions et délétions sur le gène *cyp51* au sein des populations régulièrement traitées



**Fig. 7.** Median-joining network, représentant la répartition des différents des haplotypes du gène *cyp51* dans les différentes dans une population traitée au DMI. La dimension du cercle est proportionnelle à la fréquence de l'haplotype et la couleur les différentes dates de prélèvement. Le petit point noir représente le vecteur médian des haplotypes. La longueur des branches n'est pas proportionnelle à la distance. Le numéro des haplotypes est indiqué à l'intérieur des cercles.



**Fig. 8.** Median-joining network, représentant la répartition des différents des haplotypes du gène *cyp51* dans les différentes dans la population sans traitement (j+0) en jaune, j+334 en rouge, et j+423 en bleu. La dimension du cercle est proportionnelle à la fréquence de l'haplotype et la couleur les différentes dates de prélèvement. Le petit point noir représente le vecteur médian des haplotypes. La longueur des branches n'est pas proportionnelle à la distance. Le numéro des haplotypes est indiqué à l'intérieur des cercles



**Fig. 9.** Comparaison du polymorphisme du gène *cyp51* observé chez *Mycosphaerella fijiensis* et *M. graminicola*

## **IV- CHAPITRE 3 : Stratégie d'élimination de souches résistantes aux fongicides chez *Mycosphaerella fijiensis* dans une parcelle traitée en fonction des apports de migrants sensibles**

### **1- Justification de l'étude**

Les travaux de Rieux et *al.* (2012, 2013 et 2014) ont démontré l'importance de la migration sur l'évolution de la résistance aux fongicides chez *M. fijiensis*, notamment le rôle potentiel des échanges de spores entre les zones non traitées (ZNT) et les zones traitées (ZT) dans les bassins de production de bananes dessert au Cameroun. Nous avons également démontré plus haut que l'effet de la sélection par les fongicides peut être contrebalancé par la migration d'individus sensibles. En ZNT les populations d'ascospores sont très abondantes et ces ascospores migrent à grande distance. Dans les ZT, du fait des pratiques de lutte (traitements fongicides et ablation des stades nécrotiques) seules des conidies persistent. Comme ces conidies ne dispersent qu'à de faibles distances cette situation favorise des flux migratoires asymétriques entre les ZNT et les ZT (flux d'ascospores de type sensible) qui contribuent à la diminution de la résistance en ZT. Mais ce processus de diminution « naturel » est lent.

Pour accélérer ce processus, cette étude vise à tester un scénario d'élimination de souches résistantes aux QoI dans une parcelle commerciale traitée. Ce scénario repose sur la mise en œuvre d'une combinaison de pratiques dont l'introduction artificielle de migrants sensibles. Pour cela, nous avons d'abord utilisé le modèle *Fijiensim* conçu par P. Tixier pour tester des hypothèses de l'effet des pratiques culturales sur l'évolution de la résistance aux fongicides dans une ZT. En effet, ce modèle décrit l'effet des pratiques culturales sur l'évolution de la résistance aux fongicides dans un compartiment traité (ZT) qui échange des migrants sensibles avec un compartiment non traité (ZNT). Ainsi, nous avons utilisé ce modèle pour tester des scénarios d'apports de migrants sensibles afin d'accélérer la vitesse de diminution de la résistance aux fongicides. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé ce modèle pour optimiser les stratégies d'apports afin de calibrer une expérimentation. Par la suite nous avons mis en œuvre la pratique d'apports de migrants sensibles dans une parcelle commerciale (ZT). A cet effet nous avons (i) arrêté l'application de fongicides systémiques dans la ZT ; (ii) maintenu à de faibles niveaux la taille de la population de la ZT par l'ablation régulière des plages nécrotiques (élimination des sources d'ascospores) et l'application hebdomadaire de fongicides de contact ; (iii) mesuré la fréquence initiale de la mutation G143A de la résistance aux QoI ; (iv) introduit mensuellement des migrants sensibles ; (v) mesuré la fréquence de la mutation G143A au cours du temps .

### **2- Description du modèle de simulation de l'effet des différentes pratiques culturales et des flux de gènes sur l'évolution de la résistance aux fongicides**

#### **2.1- Objectif du modèle *Fijiensim***



Le modèle *Fijiensim* a été construit à l'aide du programme Stella (version 9.1.3) par Tixier et De Lapeyre de Bellaire (communication personnelle) pour tester l'effet potentiel d'apports de migrants sensibles en intégrant les paramètres des différentes pratiques agricoles et ceux de la sélection et de la migration. Notons que ce modèle n'est pas prédictif mais il permet de décrire de quelle façon les différentes pratiques influencent l'évolution de la résistance.

## 2.2- Hypothèses du modèle

Le modèle suppose deux parcelles de bananiers proches correspondant à deux compartiments différents, dont un compartiment traité et un compartiment non traité (Fig. 1). Les principales hypothèses de ce modèle découlent (i) des travaux sur la dispersion des différents propagules de *M. fijiensis* (Rieux *et al.*, 2014), (ii) de la connaissance des populations fongiques dans ces compartiments (Rieux *et al.*, 2013) et (iii) plus particulièrement de l'observation temporelle de la résistance à un fongicide (l'azoxystrobine) sur un transect recouvrant une parcelle traitée et une parcelle de plantain non traitée voisine (Rieux *et al.*, 2011).

Ainsi, le *compartiment traité* se caractérise par :

- (i) la présence d'un seul type de spores, des conidies qui suivent une croissance logistique ;
- (ii) les conidies sont soit résistantes soit sensibles au fongicide étudié ;
- (iii) les conidies sensibles peuvent devenir résistantes par mutation, puis redevenir sensibles par mutation inverse ;
- (iv) l'acquisition de la résistance chez les souches s'accompagne d'une perte de la fitness (coût de la résistance), ce qui modifie leur taux de croissance  $r$  ;
- (v) les stratégies de traitement utilisent soit des fongicides systémiques à une fréquence qui est paramétrable, soit des fongicides de contact à une fréquence hebdomadaire. Les fongicides systémiques provoquent une faible mortalité des résistants contrairement aux fongicides de contact qui provoquent toujours une forte mortalité ;
- (vi) il est possible de basculer d'une stratégie de traitements avec des fongicides systémiques à une stratégie de traitements avec des contacts ;
- (vii) il est possible d'introduire des migrants sensibles selon différentes modalités (taille de la population apportée, date de l'apport, fréquence des apports).

Le *compartiment non traité* se caractérise par :

- (i) la présence exclusive d'ascospores et leur population est de taille constante au cours du temps; (ii) les ascospores de ce compartiment migrent vers le compartiment traité avec un taux de migration constant ;

(iii) les ascospores de ce compartiment sont considérées comme sensibles (on peut toutefois fixer un taux de résistants).

### 2.3- Les paramètres du modèle

Parmi les paramètres qui ont servi à alimenter le modèle, certains ont été déterminés de manière expérimentale, et d'autres ont été inférés à partir de l'évolution temporelle de la fréquence de la mutation G143A sur le transect englobant une ZT et une ZNT (Rieux *et al.*, 2013). Les paramètres sont classés en deux grands groupes : le groupe des paramètres initiaux des compartiments et le groupe des paramètres de gestion de la maladie (Fig. 2).

Le premier groupe comprend :

- (i) les paramètres  $r$  et  $K$  de la croissance logistique des conidies :  $K$  représente la capacité maximale de conidies qu'un bananier peut héberger. Cette capacité ne peut être évaluée qu'en ZNT où la croissance de la population de conidies est naturelle.  $r$  exprime le taux d'accroissement de la population de conidies au cours du temps.
- (ii)  $s$  le coefficient de sélection contre les souches résistantes associé à un coût de la résistance. Dans cette expérimentation on va considérer que ce coût est nul pour les fongicides QoI et que la diminution de la fréquence des individus résistants relève exclusivement de la migration de souches sensibles provenant du compartiment ZNT.
- (iii) le taux de mutation des souches sensibles en souches résistantes et le taux de mutation reverse. Il est généralement très faible chez les champignons pathogènes (Mc Donald & Linde 2002).
- (iv)- le taux de mortalité induit par les fongicides de contact qui est identique pour les résistants et les sensibles. Le taux de mortalité a été estimé à partir de comptages de conidies effectués en ZT (en condition d'utilisation de fongicides de contact) et ZNT =  $1 - \frac{\text{nombre de conidies ZT}}{\text{nombre de conidies ZNT}}$
- (v)- le taux de mortalité induit par les fongicides systémiques respectivement sur les souches sensibles et résistantes.
- (vi)- la taille de la population d'individus résistants et sensibles dans les compartiments ZT et ZNT.
- (vii)- Le taux de migration d'ascospores de la ZNT vers la ZT. Le taux de migration  $m$  de ZNT vers ZT est donné par l'équation

$$m \frac{Nut}{Nt} = \left( \frac{pt0 - pt}{pt - put} \right)^{\frac{-1}{t}} - 1$$

où  $N_t$  et  $N_{ut}$  sont les tailles de population dans les ZT et ZNT,  $p_t$  et  $p_{ut}$  les fréquences de résistants à un temps  $t$  en ZT et ZNT (Rieux, 2011).

(ix)- la taille de la population sensible en ZNT

Le deuxième groupe comprend les dates des traitements fongicides de contact et systémique (définis par une date de début et de fin et par un intervalle entre deux traitements) et les dates d'apports des migrants sensibles (taille de l'apport et fréquence de l'apport).

#### 2.4- Equations du modèle

$$S_t = r S_{t-1} (N_{t-1} - K) / K + F_{S_t} - (D_{x_t} * X^S * N_{t-1}) - (D_{y_t} * Y^S * N_{t-1}) - (M^S * S_{t-1}) + (M^R * R_{t-1})$$

$$R_t = r R_{t-1} (N_{t-1} - K) / K + F_{R_t} - (D_{x_t} * X^R * N_{t-1}) - (D_{y_t} * Y^R * N_{t-1}) - (M^R * R_{t-1}) + (M^S * S_{t-1})$$

$$N_t = S_t + R_t$$

Avec  $S_t$  et  $R_t$  respectivement les tailles des populations de sensibles et de résistant au pas de temps  $t$ ;  $N_t$  la taille de la population totale;  $r$  le taux d'accroissement naturel de la population;  $K$  la charge du milieu;  $s$  le coût de la résistance;  $N_{ut}$  et  $N_t$  respectivement la taille de la population en ZNT et en ZT;  $m$  le taux de migration;  $A$  la taille des apports de migrants sensibles;  $D_{x_t}$  et  $D_{y_t}$  les dates d'applications des fongicides de contact et systémique;  $X^S$  et  $Y^S$  respectivement les taux de mortalité des spores sensibles par les fongicides de contact et systémique;  $X^R$  et  $Y^R$  les taux de mortalité des spores résistantes par les fongicides de contact et systémique;  $M^S$  et  $M^R$  le taux de mutation des sensibles en résistants et le taux de mutation reverse des résistants en sensibles.

#### 2.5- Utilisation du modèle *Fijiensim* pour décrire l'évolution de la résistance dans une situation réelle de ZT et ZNT

Le modèle *Fijiensim* a d'abord été utilisé pour décrire le processus de diminution de la fréquence de la mutation G143A dans une ZT (parcelle de Lala de 5 ha = 9000 bananiers) jouxtant une ZNT (parcelle de 500 bananiers plantains) (Rieux, 2011) sous l'hypothèse que seule la migration est à l'origine de la diminution de la fréquence de la mutation G143A lorsque des fongicides systémiques du groupe des QoI ne sont plus employés et que les stratégies de traitements ont basculé vers l'emploi de fongicides de contact (Fig. 2). La ZT de bananiers desserts destinés à l'export était cultivée avec une seule variété grande naine du sous-groupe Cavendish, cultivée de manière intensive avec une forte densité de peuplement (1800 à 2000 pieds/ha), et traitée contre les maladies et ravageurs. Dans la ZNT, la parcelle était pluri-variétales composée principalement de plantains et autres bananes à cuire cultivés en faible densité (100 à 500 pieds/ha) en association avec d'autres cultures vivrières et de manière extensive sans application d'intrants.

##### 2.5.1- Paramètres initiaux pour les simulations

Ces paramètres initiaux sont rappelés dans le tableau 3 et la figure 2. Certains paramètres initiaux ont été mesurés de manière expérimentale.

Ainsi, nous avons d'abord déterminé le nombre de conidies moyen par bananier dans la ZT et le nombre d'ascospores et de conidies moyen par bananier dans la ZNT suivant la méthode décrite par Rieux *et al.*, (2013). On a pu ainsi estimer une moyenne de 84000 conidies et  $1,6.10^9$  ascospores par plant en ZNT contre 5200 conidies par plant en ZT (Tableau 1) (Rieux *et al.*, 2013).

D'autres paramètres, comme le taux de migration, ont été inférés à partir de l'évolution de la résistance en considérant que cette évolution n'était le fait que de la seule migration d'individus sensibles de la ZNT vers la ZT (Rieux, 2011).

(i) Estimation de la taille des populations dans les compartiments ZT et ZNT :  $N_{ut} = \text{nb d'ascospores/bananier} \times \text{nb bananiers ZNT} = 1,6.10^9 \times 500 = 8.10^{11}$  et  $N_t = \text{nb conidies/bananier} \times \text{nb bananiers ZT} = 4,7.10^7$ .

(ii) La charge maximale du milieu  $K$ : la valeur de ce paramètre est donnée par le nombre maximal de conidies que pourraient porter 9000 bananiers de la parcelle ZT :  $9000 \times \text{nb maximal de conidies/bananier} = 9000 \times 84000 = 756.10^6$

(iii) Le cout de la résistance  $s$  a été fixé comme étant nul parce qu'on considère comme hypothèse majeure que seule la migration provoque des changements dans l'évolution de la résistance

(iv) le taux de migration a été calculé à partir de la formule  $m \frac{N_{ut}}{N_t} = \left( \frac{p_{t0}-p_t}{p_t-p_{ut}} \right)^{\frac{-1}{t}} - 1$

$t=13$  générations d'ascospores ;  $N_{ut}/N_t=17021$  ;  $\left( \frac{p_{t0}-p_t}{p_t-p_{ut}} \right)^{\frac{-1}{t}} = [(0,188-0,109)/(0,109-0)]^{-1/13}=0,647$

$m = (0,647-1)/17021 = 2,06.10^{-5}$

(v) le taux de mortalité des spores par les fongicides de contact :  $X^s = \left[ 1 - \frac{\text{nombre de conidies ZT}}{\text{nombre de conidies ZNT}} \right] \times 100 = (1-0,062) \times 100 = 94\%$

Le taux de mortalité des fongicides systémiques sur les résistants a été fixé faible à 10%, par contre il a été fixé à 80% sur les sensibles.

(vi) les taux de mutation de résistant à sensible et vice versa ont été fixés à des valeurs décrites (respectivement  $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ ) communément chez les champignons pathogènes (Mc Donald and Linde, 2002).

La simulation a été réalisée sur une période de 800 jours qui englobe la période de mesure de la fréquence de la mutation G143A sur ce dispositif entre 2009 et 2011.

Concernant les pratiques, le modèle a été paramétré de la manière suivante :

- Pas d'application du fongicide systémique (QoI) au cours de cette période
- application de manière systématique des fongicides de contact à intervalle de 7 jours.

- aucun apport de migrants sensibles au cours de cette période

Les simulations du modèle ont été comparées avec l'évolution réelle des fréquences de la mutation G143A de 2009 à 2011. La valeur du coefficient d'accroissement des conidies  $r$  a été fixée de façon à ajuster les simulations du modèle au jeu de données. En fixant une valeur de  $r$  à 0,264 les simulations du modèle s'ajustent correctement aux fréquences mesurées en 2009, 2010 et 2011 (Fig. 3). Cette estimation de la valeur de  $r$  sera par la suite reprise pour les simulations ultérieures des effets des pratiques.

#### 2.6- Utilisation du modèle *Fijiensim* pour évaluer les effets d'apports de migrants sensibles

Le modèle *Fijiensim* a été employé pour tester différents scénarios d'apports de migrants sensibles de manière artificielle visant à accélérer la dérive de la résistance.

##### 2.6.1. Les caractéristiques du site expérimental choisi

Un site expérimental potentiel a été identifié dans une parcelle commerciale de 2 hectares (ZT) à Dia-Dia (4°60'N, 9°63'E) (confère Fig. 1 du III.1 au chapitre 2). Les caractéristiques de ce site ont au préalable servi pour tester et raisonner la pratique des apports de migrants sensibles. Ce site a été choisi du fait de (i) la présence de souches résistantes aux QoI ; (ii) la situation géographique représentée par une petite parcelle de 2 ha isolée à la marge d'un grand bloc de plantation (60 ha) et (iii) de l'éloignement de zones de contact avec des parcelles de plantain non traitées permettant de limiter la migration de souches résistantes qui seraient dans cette zone de contact (Fig. 4).

##### 2.6.2- Paramètres initiaux pour les simulations

Pour cette simulation nous avons considéré qu'il n'y avait pas de migration d'ascospores de la ZNT vers la ZT et qu'il n'y avait pas non plus de coût de la résistance (Tableau 4).

(i) la taille de la population initiale :  $Nt = 4665 \times 4000 = 1,8.10^7$ .

(ii) La charge maximale du milieu  $K = 4000 \times 84000 = 336.10^6$

(iii) Le coût de la résistance  $s$  a été fixé nulle parce qu'on considère que seule la migration provoque des changements dans l'évolution de la résistance.

(v) le taux de mortalité des spores par les fongicides de contact  $X^s_c = 94\%$

(vi) les taux de mutation de résistant à sensible et vice versa ont été fixés faibles ( $10^{-6}$  et  $10^{-7}$ ) tel qu'il est communément connu chez les champignons pathogènes (Mc Donald and Linde, 2002).

(vii) le taux de croissance de conidies  $r$  a été fixé à 0,264 à partir de la simulation précédente.

La simulation a été réalisée sur une période de 800 jours (Fig. 5).

Concernant les pratiques, le modèle a été paramétré de la manière suivante :

- Pas d'application du fongicide systémique (QoI) au cours de cette période

- application de manière systématique des fongicides de contact à intervalle de 7 jours.

#### *2.6.3- Simulation de l'effet de différents modes d'apports de migrants sensibles*

Afin d'optimiser la stratégie d'apports des migrants sensibles, nous avons fait varier : la taille de la population apportée et l'intervalle des apports de migrants sensibles (de 20 à 180 jours). Notons que la taille de la population à apporter a été définie en fonction de la taille de la population résidente dans la parcelle et nous avons testé une gamme allant de 2 à 18 fois la taille de la population résidente. Une analyse de l'interaction de la taille et l'intervalle des apports sur la valeur de la fréquence de la mutation G143A à 200 jours a été simulée pour ces différentes combinaisons. Cette simulation a montré qu'il n'est pas nécessaire d'augmenter de manière importante la taille des apports parce qu'en apportant déjà l'équivalent de 4 fois la taille de la population résidente le niveau de la résistance chute à son plus bas niveau (Fig. 5). Par ailleurs, il est plus judicieux de fragmenter les apports notamment à un intervalle de 30 jours pour faire rapidement chuter la résistance. L'idéal serait alors un apport équivalent à 4 fois la taille de la population résidente tous les mois (Fig. 5).

#### *2.6.4- Simulation de l'effet d'un apport de migrants sensibles sur la dynamique de l'évolution de la résistance*

Ici nous avons comparé l'effet des apports de migrants sensibles (sans migration ZNT vers ZT) par rapport à un effet de la migration de migrants sensibles d'une ZNT vers une ZT en adaptant à ce dispositif expérimental les paramètres de migration fixés sur le dispositif de Lala.

Pour les apports de migrants sensibles, les paramètres initiaux étaient les mêmes et l'apport a été fixé à deux fois la taille de la population apportée tous les mois. La simulation montre que l'on peut s'attendre à une forte diminution de la fréquence de la mutation G143A en 365 jours lorsqu'on apporte des migrants sensibles équivalents à 2 fois la taille de la population résidente à intervalle régulier de 30 jours (Fig. 6). La courbe rouge représente l'évolution de la résistance dans la population sans les apports artificiels de migrants. Cette dynamique résulte du seul effet de la migration comme paramétrée sur Lala. L'effet de cette pratique semble donc à priori intéressant pour accélérer la dynamique de diminution de la résistance par rapport à la migration d'ascospores provenant d'une ZNT telle que paramétrée antérieurement.

### **3. Expérimentation de la pratique d'apports de migrants sensibles en ZT**

Nous avons mis en place cette expérimentation sur la base des simulations antérieures avec le modèle *Fijiensim*. Cette mise en œuvre s'est déroulée en plusieurs étapes (Fig. 7).

#### *3.1- Le contrôle de la maladie au champ*

##### *3.1.1- Traitements fongicides*

Au démarrage de l'expérimentation l'application de fongicides systémiques sur la parcelle a été stoppée pour interrompre la sélection de souches résistantes. A cet effet, la parcelle a été balisée à l'aide de fanions rouge/blanc pour faciliter le repérage lors des traitements aériens afin d'éviter la dérive de fongicides systémiques qui pourraient être appliqués dans les parcelles voisines (Fig. 4). Seuls des fongicides de contact (mancozebe) ont été appliqués sur cette parcelle de manière systématique et hebdomadaire tout au long de l'expérimentation. Ces fongicides ne sélectionnent pas de souches résistantes et sont employés en prévention des infections. Ils induisent une forte mortalité sur les souches résistantes et sensibles aux fongicides systémiques.

### 3.1.2- Contrôle des sources d'inoculum dans la parcelle expérimentale

Combiné à l'application des fongicides de contact, un programme d'ablation des lésions de stade 4 et nécrotiques (stades 5 et 6) (selon l'échelle de Fouré 1988) a été appliqué pour éliminer les sources d'ascospores présentes dans la parcelle. Ces ablations ont été très sévères au démarrage pour faire chuter fortement la taille de la population de spores résidentes, puis réalisés en routine chaque semaine.

### 3.2- Source de migrants sensibles

Des feuilles nécrosées servant à apporter des souches sensibles ont été prélevées sur une plantation de plantains non traités d'un jardin de case situé à Penda Boko (4°22N, 9°34E) à une distance d'environ 50 km des zones traitées où aucune souche portant la mutation G143A n'a été retrouvée (confère Fig. 1 du III.1 au chapitre 2). Les nécroses foliaires ont été prélevées par temps sec et transportées au laboratoire où des larges plages nécrotiques ont été découpées et agrafées sur de la toile de moustiquaire montée sur du fil de fer pour confectionner des feuilles artificielles (1958 cm<sup>2</sup>) (Fig. 8) suivant la méthode décrite par Rieux *et al.* (2014).

### 3.3- Apports de migrants sensibles à partir de feuilles artificielles portant des nécroses foliaires

Les feuilles artificielles portant des nécroses foliaires ont été fixées sur des mats à 1,75 m du sol (Fig. 8) et réparties à équidistance de 16 m dans la parcelle expérimentale (Fig. 9). 72 feuilles artificielles au total ont été implantées au démarrage de l'expérimentation, et nous avons estimé que cette surface de nécroses correspondait à un apport d'une population d'ascospores au moins égale à 2 fois la taille de la population de conidies présente sur les bananiers de la parcelle traitée (ZT). La quantité d'ascospore correspondant à la surface nécrotique à apporter a été estimée à partir de la loi de Burt *et al.* (1999) :  $\text{Ln}(\text{nombre ascospores}) = 1,173 \times \text{Ln}(\text{surface nécrosée}) + 6,128$ . Le modèle *Fijiensim* étant paramétré sur un événement de dispersion au cours duquel toutes les ascospores utiles sont produites, nous faisons alors l'hypothèse que la formule de Burt se situerait donc au 10<sup>e</sup> de cette quantité utile d'ascospores. Au total 11 apports de feuilles artificielles ont été réalisés en 12 mois à intervalle de 1 à 2 mois (Fig. 7). Les feuilles artificielles ont été renouvelées à chaque fois juste après une application de fongicides.

### *3.4- Evolution de la taille de la population et de la fréquence de la mutation G143A dans parcelle expérimentale*

#### *3.4.1- Evolution de la taille de la population*

La taille de la population de conidies a été mesurée au cours du temps pour piloter la stratégie des apports et aussi pour éviter les dérapages de contrôle de la maladie. Ces mesures ont été réalisées suivant la méthode décrite par Rieux *et al.*, (2013) (Fig. 10).

#### *3.4.2- Détection moléculaire de la mutation G143A*

L'échantillonnage a été réalisé sur 96 bananiers (Fig. 9) suivant la procédure décrite en 2.5.2 chapitre 2. L'extraction de l'ADN a été faite sur les différents bulks de disques de lésion à l'aide de la procédure décrite par Robert *et al.* (2010). Une PCR a été réalisée pour amplifier une portion de 77 bp du gène du cytochrome b contenant la mutation G143A qui confère la résistance aux QoI à l'aide de la méthode décrite par Rieux *et al.* (2013). La détection moléculaire et la fréquence de la mutation G143A sur les produits PCR a été réalisée à l'aide de la technique de pyroséquençage à Bayer CropScience, Research Disease control, Monheim, Allemagne.

Une analyse a été réalisée en juin 2012 avant le premier apport, puis deux autres analyses en octobre 2012 et en mai 2013, 322 après le premier apport.

#### *3.4.3- Analyses statistiques*

A chaque date, la fréquence de la mutation G143A a été mesurée sur 10 lésions par bananier et répété sur 96 bananiers pris de manière aléatoire. Ces fréquences ont été analysées par une ANOVA appliquée par un modèle linéaire généralisé suivant une loi binomiale à l'aide du logiciel R 3.0.2. La loi binomiale a été considérée parce que chaque valeur est issue d'un comptage aléatoire du nombre de lésions provenant de souches résistantes parmi les 10 analysées. Les moyennes ont été comparées par le test de Tukey avec le même logiciel.

## **4- Résultats - Discussion**

### *4.1. Evolution démographique des populations dans la parcelle traitée*

La taille de la population de conidies par bananier a varié de 5000 à 35000 conidies au cours de l'expérimentation. Deux interruptions imprévues des traitements au cours des 10 premières semaines ont entraîné une augmentation brutale de la population jusqu'au pic de 35000 conidies (Fig. 11). Cette remontée s'est traduite par une augmentation du niveau de maladie au champ. Par la suite des ablations sévères de feuilles portant des lésions de stade 4 (selon l'échelle de Fouré 1988) et les applications régulières de fongicide de contact ont permis de rétablir la situation, au terme de plusieurs semaines, aux niveaux attendus dans une ZT dans laquelle des fongicides de contact sont employés sur la base de traitements hebdomadaires (Rieux *et al.*, 2013).

### *4.2. Evolution de la fréquence de la mutation G143A.*



Au cours de cette période durant laquelle les populations fongiques n'ont pas été maîtrisées, la fréquence de la mutation G143A a significativement augmenté ( $p < 0,05$ ) passant de sa valeur initiale de 0,175 dans  $P_0$  à une valeur de 0,27 dans  $P_1$  (Tableau 5). Ainsi, l'augmentation de la taille de la population résidente (près de 7 fois supérieure à ce qui était attendu) a fait que les quantités de migrants apportées étaient insuffisantes pour provoquer une diminution de la résistance selon les prévisions du modèle (Fig. 10). A partir du moment où les traitements ont repris avec la cadence attendue et que les populations sont progressivement revenues à l'équilibre, nous avons reconsidéré une nouvelle date initiale de l'expérimentation ( $j+0$ ). Après 4 nouveaux apports de migrants, la fréquence de la mutation G143A a fortement diminué ( $p < 0,00001$ ) atteignant la valeur de 0,085 à la nouvelle date  $P_2$  ( $J+208$ ) (Tableau 5), à cette date là, le modèle prévoyait une valeur proche de 0,05 (Fig. 12). Cette observation semble indiquer que les apports de migrants sensibles ont permis de diminuer la fréquence de la mutation G143A. Par rapport à nos hypothèses de départ, ce résultat semble indiquer qu'il est possible d'accélérer la diminution de la résistance à l'aide de la technique d'apports de migrants sensibles. Ce résultat reste toutefois à confirmer lors prochaines analyses d'échantillons à  $j+360$  et  $j+514$ . Par la suite cette tendance devra être confirmée en analysant la fréquence de la mutation E198A de la résistance aux MBC à toutes les dates de prélèvements.

## 5- Conclusion

Cette étude est originale parce qu'elle constitue la toute première approche d'expérimentation d'une stratégie de gestion des résistances aux fongicides reposant à la fois sur les stratégies de traitement et l'introduction de migrants sensibles dans une parcelle commerciale. De nombreuses difficultés ont été rencontrées lors de la mise en place et de cette expérimentation en parcelle commerciale en raison des craintes suscitées par un apport d'inoculum dans la parcelle. L'augmentation de la taille de la population au début de l'expérimentation a été notamment due au fait que la cadence des traitements n'a pas été respectée. Mais lorsque les choses sont revenues à la normale, les populations ont été maîtrisées. Cette expérimentation semble montrer l'intérêt potentiel de cette stratégie pour diminuer la résistance au champ, ces observations doivent être confirmées lors des prochaines analyses. Enfin, cette stratégie est réaliste en pratique car un apport de 40 feuilles par hectare ne devrait pas représenter une trop forte contrainte en main d'œuvre et en logistique par rapport aux effets bénéfiques attendus de ces apports.

## Références bibliographiques

- Burt, P.J.A., Rosenberg, L.J., Rutteri, J., Ramirez, F., Gonzales, H., 1999. Forecasting the airborne spread of *Mycosphaerella fijiensis*, a cause of black Sigatoka disease on banana: estimations of numbers of perithecia and ascospores. *Ann. appl. Biol.* 135, 369-377.
- Fouré, E., 1988. Stratégies de lutte contre la cercosporiose noire des bananiers et plantains provoquée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. L'avertissement biologique au Cameroun. *Evaluation des possibilités d'évaluation. Fruits* 43, 269-274.

Ngando, J.E., Rieux, A., Nguidjo, O., Pignolet, L., Dubois, C., Mehl, A., Zapater, M.F., Carlier, J., de Lapeyre de Bellaire, L., 2014. A novel and more reliable bioassay to monitor fungicide sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science* 71, 441-451.

Rieux, A., Lenormand, T., Carlier, J., Lapeyre de Bellaire, L., Ravigné, V., 2013. Using neutral cline decay to estimate contemporary dispersal: a generic tool and its application to a major crop pathogen. *Ecology letters* 16, 721-730.

Rieux, A., Soubeyrand, S., Bonnot, F., Klein, E.K., Ngando, J.E., Mehl, A., Ravigne, V., Carlier, J., de Lapeyre de Bellaire, L. 2014. Long-Distance Wind-Dispersal of Spores in a Fungal Plant Pathogen: Estimation of Anisotropic Dispersal Kernels from an Extensive Field Experiment. *PLoS one* 9, e103225.

Robert, S., Rieux, A., Argout, X., Carlier, J., Zapater, M.-F., 2010. Optimized genotyping with microsatellite markers in the fungal banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis* (Mycosphaerellaceae). *American journal of botany* 97, e130-e132.

Tableau 1 : valeur moyenne et écart type pour l'estimation de la taille de la population chez *M. fijiensis* en plantation zone traitée et non traitée de Lala

	Nombre de lésion par plant	Surface nécrosée par plant (m <sup>2</sup> )	Nombre de conidies par plant	Nombre d'ascospores par plant
Zone non traité	5845±2637	5,3±2,3	84172±40493	1,6.10 <sup>9</sup> ±8,1.10 <sup>7</sup>
Zone traité	164±124	0,00008±0,0002	5214±5456	489±950

Source : Rieux *et al.*, 2013

Tableau 2 : Fréquences de résistants dans la population de la zone traitée de Lala

Années	Fréquence allélique
2009	0,188
2010	0,1094
2011	0,060

Tableau 3: valeurs paramétriques estimées en zone traitée (ZT) de Lala

Paramètres	Symboles	Valeurs
Fréquence de la mutation G143A en 2009	$p_t$	0,188
Taille de la population dans la ZNT	$N_{ut}$	8.10 <sup>11</sup>
Taille de la population sensible au temps $t$	$S_t$	38 103 912
Taille de la population résistante au temps $t$	$R_t$	8 822 088
Taille de la population totale	$N_t$	46 926 000
<sup>a</sup> Taux d'accroissement naturel de la population	$r$	-
Charge maximale du milieu de la population	$K$	757 539 000
<sup>b</sup> Coût de la résistance	$s$	0
<sup>c</sup> Taux de migration	$m$	2,06.10 <sup>-5</sup>
Taux de mortalité des spores sensibles par les fongicides de contact	$X^S$	94 %
Taux de mortalité des spores sensibles par les fongicides systémiques	$Y^S$	80 %
Taux de mortalité des spores résistantes par les fongicides de contact	$X^R$	94 %
Taux de mortalité des spores résistantes par les fongicides systémiques	$Y^R$	10%
<sup>d</sup> Taux de mutation des sensibles en résistants	$M^S$	10 <sup>-6</sup>
Taux de mutation des résistants en sensibles	$M^R$	4,5.10 <sup>-7</sup>

<sup>a</sup> valeur théorique obtenue à partir de la simulation de la décroissance de la fréquence de résistants entre 2009 à 2011 ; <sup>b</sup> le coût de la résistance est connu nulle pour le fongicide QoI ; <sup>c</sup> inféré sur 12 mois soit 12 générations

d'ascospore/an migrant de manière asymétrique de la zone non traitée vers la traitée ; <sup>d</sup> le taux de mutation est connu faible chez les champignons, et d'avantage négligeable en absence de pression de sélection (pas de traitement systémique depuis 2004).

Tableau 4 : valeurs paramétriques estimées en zone traitée sur le site expérimental de Dia-Dia

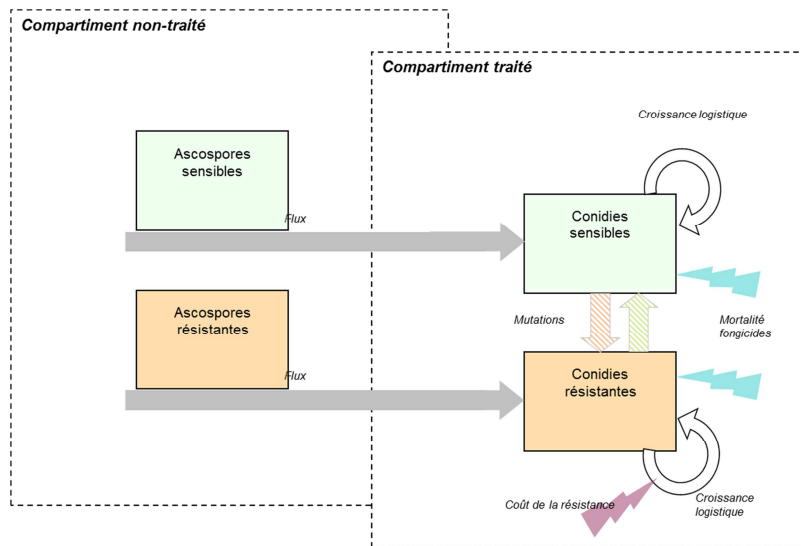
Paramètres	Symboles	Valeurs	Type de mesure
Fréquence initiale de la mutation G143A	$p^t$	0,27	Analyse d'échantillon
Nombre moyen de conidies par plant		5000	(Nombre de conidies par lésion) x (nombre de lésions)
Taille de la population sensible au temps $t$	$S_t$	97 000 000	Inféré de la fréquence de la mutation G143A
Taille de la population résistante au temps $t$	$R_t$	35 000 000	Inféré de la fréquence de la mutation G143A
Taille de la population totale	$N_t$	132 000 000	Nombre de conidies moyen x nombre de bananiers
<sup>a</sup> Taux d'accroissement naturel de la population	$r$	0,264	Fixé
Charge maximale du milieu de la population	$K$	33 600 000	Inféré de la taille totale de population
<sup>b</sup> Coût de la résistance	$s$	0	Fixé à 0
Taux de mortalité des spores sensibles par les fongicides de contact	$X^S$	94 %	$1 - \frac{\text{nombre de conidies ZT}}{\text{nombre de conidies ZNT}} \times 100$
Taux de mortalité des spores sensibles par les fongicides systémiques	$Y^S$	80 %	Fixé
Taux de mortalité des spores résistantes par les fongicides de contact	$X^R$	94 %	$1 - \frac{\text{nombre de conidies ZT}}{\text{nombre de conidies ZNT}} \times 100$
Taux de mortalité des spores résistantes par les fongicides systémiques	$Y^R$	10%	Fixé
<sup>d</sup> Taux de mutation des sensibles en résistants	$M^S$	$10^{-6}$	(Mc Donald and Linde, 2002)
Taux de mutation des résistants en sensibles	$M^R$	$4,5.10^{-7}$	(Mc Donald and Linde, 2002)

<sup>a</sup> valeur théorique obtenue à partir de la simulation de la décroissance de la fréquence de résistants entre 2009 à 2011 ; <sup>b</sup> le cout de la résistance est connu nulle pour le fongicide QoI ; <sup>c</sup> inféré sur 12 mois soit 12 générations d'ascospore/an migrant de manière asymétrique de la zone non traitée vers la traitée ; <sup>d</sup> le taux de mutation est connu faible chez les champignons, et d'avantage négligeable en absence de pression de sélection (pas de traitement systémique depuis 2004).

Tableau 5 : Comparaison de la fréquence de la mutation G143A avant et pendant les apports de migrants sensibles. La variance des fréquences a été analysée par un modèle linéaire généralisé suivant une loi binomiale et les moyennes ont été comparées à l'aide du test Tukey.

	Fréquence de la mutation G143A	$p$ -value
P <sub>0</sub>	0,175	
P <sub>1</sub>	0,27	
P <sub>2</sub>	0,085	
P <sub>0</sub> , P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub>		<0,00001***
P <sub>0</sub> , P <sub>1</sub>		0,0028*
P <sub>0</sub> , P <sub>2</sub>		<0,008*
P <sub>1</sub> , P <sub>2</sub>		<0,00001***

P<sub>0</sub> : Population initiale avant les apports de migrants sensibles (j+0), P<sub>1</sub> : population à j+114 (3 apports de migrants sensibles cumulés), P<sub>2</sub> : population à j+322 (9 apports cumulés). \*\*\*différence hautement significative, \*différence significative.



**Fig. 1.** Schéma descriptif des hypothèses du modèle *Fijiensim*

### PARAMETRES ET INITIALISATION

**Parameters**

r conidies	0,264
Resistance cost	0
K conidies T	757
Tmutation S R	1e-006
T mutation reverse	4,5e-007
taux de dispersion	2e-005

**Initial populations**

St	38
Rt	8,8
S NT	8000
Taux resistant NT	0,03

**mortalité fongicides**

Tmortalité contact	0,94
Tmortalité syst S	0,8
Tmortalité syst R	0,1

### PRATIQUES DE GESTION DE LA MALADIE

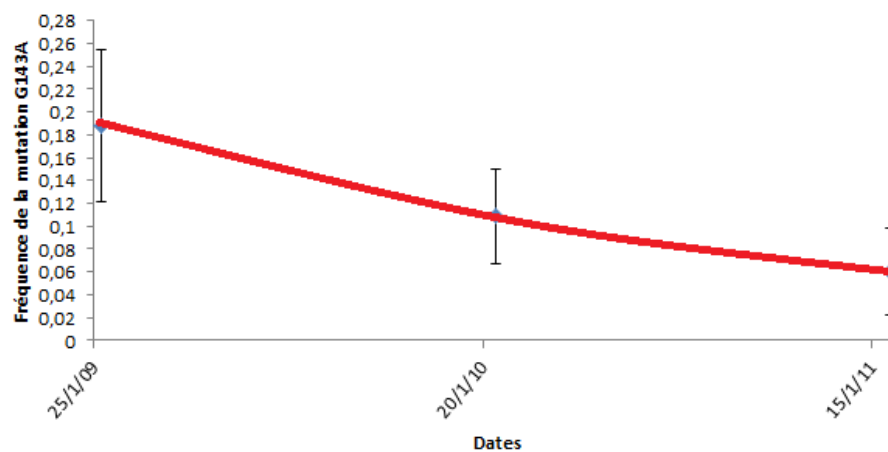
**Gestion systémiques**

début syst	4000
fin syst	4000
interval traitement systemique	30

**Gestion contacts**

début contact	0
fin contact	2500
interval traitement contact	7

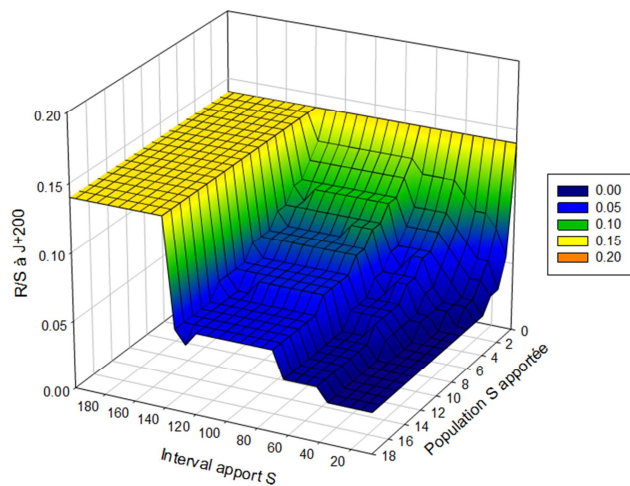
**Fig. 2.** Les fenêtres du modèle *Fijiensim* avec les valeurs paramétriques de la zone traitée de Lala



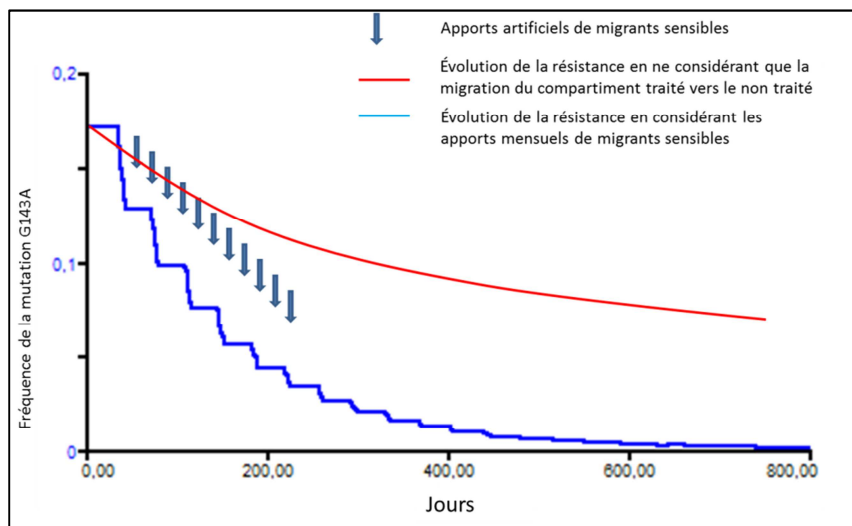
**Fig. 3.** Comparaison d'une simulation de l'évolution de la résistance par le modèle *Fijiensim* réalisé sur la zone traitée de Lala de 2009 à 2011.



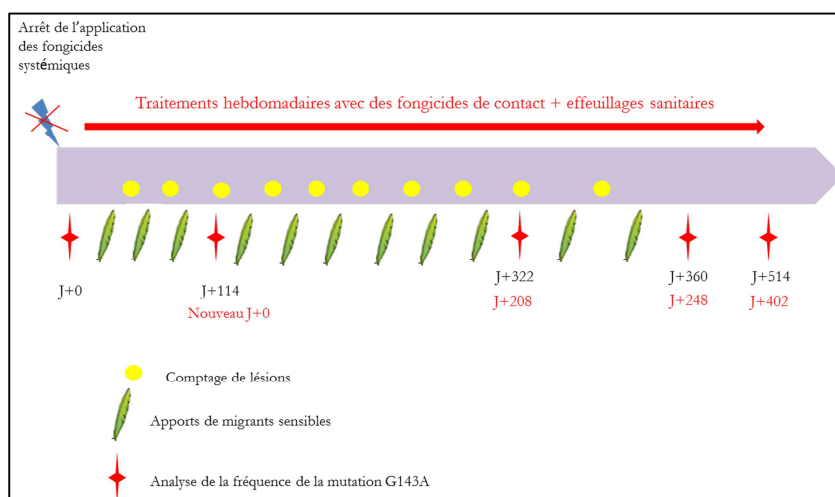
**Fig. 4.** Parcelle expérimentale au milieu d'un grand bloc de la plantation commerciale de Dia Dia



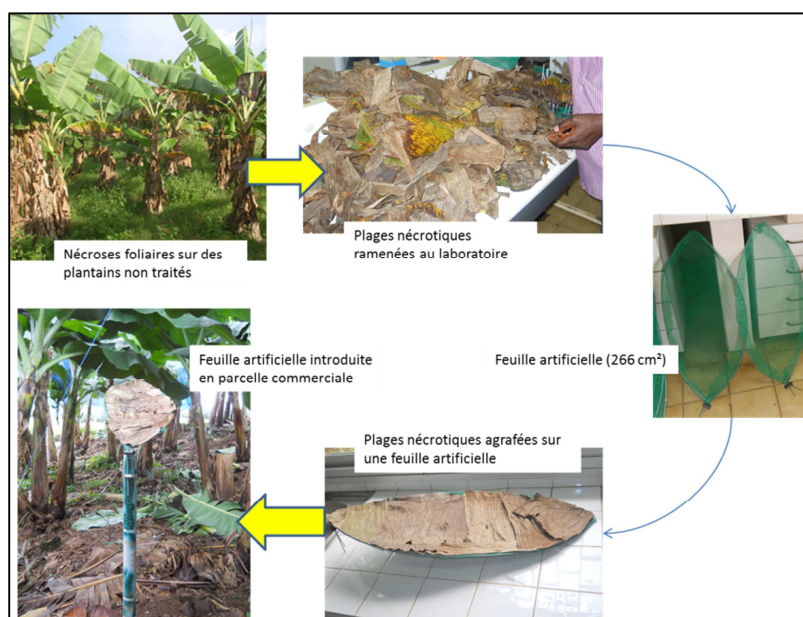
**Fig. 5.** Variation de la résistance en fonction de la taille et la fréquence des apports de migrants sensibles. (*Source* : P. Tixier).



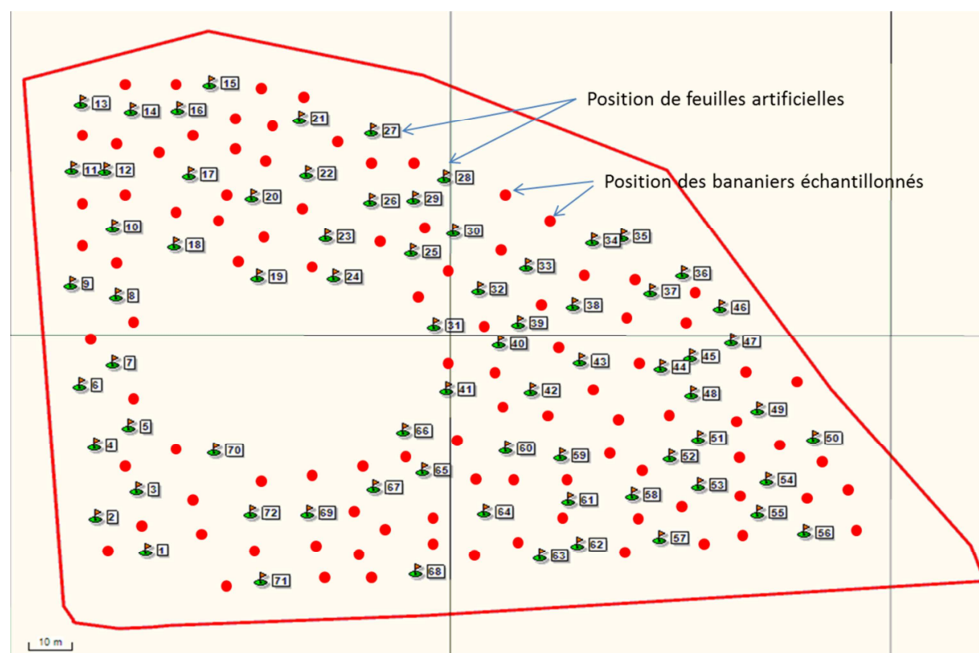
**Fig. 6.** Simulation des effets des apports artificiels de migrants sensibles sur l'évolution de la fréquence de la mutation G143A



**Fig. 7.** Schéma des étapes d'opérations pour la mise en œuvre de la pratique d'apports de migrants sensibles



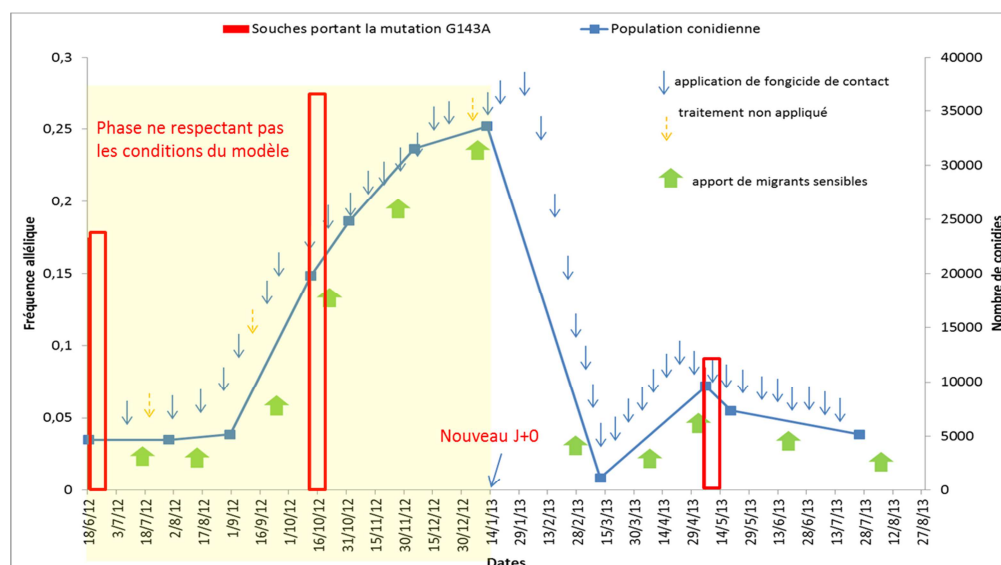
**Fig. 8.** Préparation et introduction des sources de migrants sensibles



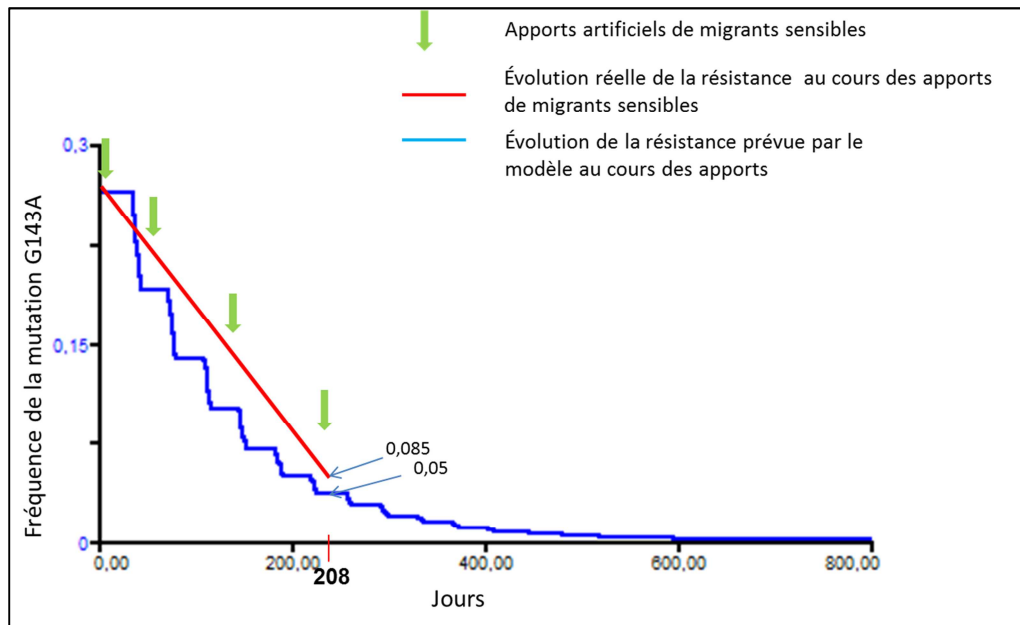
**Fig. 9.** Carte de distribution des feuilles artificielles sur la parcelle expérimentale du site de Dia-Dia.



**Fig. 10.** Comptage de lésions pour mesurer la taille de la population en parcelle commerciale



**Fig. 11.** Evolution de la fréquence de la mutation G143A et la taille de la population en fonction des apports de migrants sensibles



**Fig. 12.** Comparaison de l'évolution de la fréquence de la mutation G143A entre les prévisions du modèle et la réalité de la pratique des apports de migrants sensibles





## V- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'originalité des études menées dans cette thèse repose sur la mise en place d'expérimentations au champ dans des conditions où les facteurs susceptibles d'interférer sont contrôlés. Ces approches ont l'avantage d'être réalisées dans des conditions proches de la production réelle, certaines ont été réalisées de manière participative avec les producteurs notamment la pratique d'apports de migrants sensibles. Les résultats produits de ces recherches présentent alors un fort potentiel d'adoption chez les producteurs qui sont les utilisateurs finaux.

La nécessité de suivre de manière précise l'évolution de la résistance dans les dispositifs expérimentaux au champ nous a amené à d'abord améliorer les méthodes biologiques de mesure de la résistance. Nous avons alors proposé la méthode conidie basée sur des tests de germination des conidies récoltées à partir de jeunes lésions de la maladie. Cette nouvelle méthode résout plusieurs problèmes posés par la méthode classique qui était basée sur des tests de germination d'ascospores. Avec la méthode conidie il est possible de réaliser le test en temps voulu et de respecter un plan d'échantillonnage. Cette méthode permet aussi d'éviter les problèmes de confusion entre espèces du genre *Mycosphaerella* et de comparer la réponse d'une même population sur le milieu en présence et en absence de fongicide. Nous avons montré que cette méthode était plus répétable que la méthode basée sur des tests de germination d'ascospores, mais cette méthode a aussi ses limites. En effet, nous avons montré qu'il y a un risque de mélange de génotypes différents dans une même lésion, ce qui peut affecter la précision de la mesure obtenue. Donc, pour des mesures précises de la résistance, cette méthode n'est pas adaptée, mais elle reste performante pour des monitorings de la résistance effectués en routine dans les zones de productions où les outils moléculaires ne sont généralement pas disponibles.

Le bénéfice principal apporté par cette étude pour nos travaux a été l'amélioration de la technique d'échantillonnage. En effet, cette méthode nous a orienté vers l'échantillonnage de jeunes lésions sur les feuilles ce qui permet de respecter un plan d'échantillonnage dans le temps. Si nous avions échantillonné des stades nécrotiques il n'aurait pas été possible de prélever des échantillons à un temps désiré toujours sur les mêmes bananiers.

Nous avons obtenu une estimation du coefficient de sélection pour la résistance aux QoI de  $s = 0,754$  à partir du suivi de l'augmentation de la fréquence de la mutation G143A dans un dispositif dédié en l'absence de migration. Cette estimation est la première pour ce fongicide en général et chez *M. fijiensis* en particulier. Cette valeur est très élevée par rapport aux valeurs connues chez d'autres couples fongicide-pathogène et paraît cohérente avec de la rapidité d'évolution de la résistance observé pour ce fongicide chez les divers pathogènes inféodés à diverses cultures. L'estimation de ce coefficient de sélection a été obtenue au champ dans des conditions proches de la réalité de la production et paraît

alors réaliste et adaptée pour des applications directes au champ. Cette valeur peut maintenant permettre d'alimenter des modèles de régulation de la résistance intégrant les autres forces évolutives et des facteurs bioclimatiques afin de permettre de prédire son évolution.

L'estimation du coefficient de sélection pour la résistance aux QoI en présence de la migration est plus faible (0,448). Cette différence serait donc due à la migration et son intégration dans un modèle génétique pourrait nous permettre d'estimer un taux de migration naturel. Nous allons ensuite déterminer la fréquence de la mutation G143A en absence de fongicides à deux dates de prélèvement pour estimer un coefficient de contre-sélection de la mutation G143A

Pour la résistance aux DMI, un coefficient de sélection n'a pas encore été déterminé mais le séquençage du gène *cyp51* qui est le support des mécanismes de résistance a révélé un polymorphisme plus important que celui connu à ce jour chez *M. fijiensis*. Il a notamment mis en lumière d'une part le détail des insertions et des mutations présentes dans la région prédite du promoteur et qui semblent augmenter en fréquence sous l'effet de la sélection, d'autre part l'apparition d'une nouvelle mutation D460V non décrite à ce jour dans la zone codante. Les génotypes observés doivent être reliés à des phénotypes correspondants caractérisés par une CI50 (concentration du fongicide qui inhibe 50% du tube germinatif), puis il faudra calculer un gradient de sélection à partir du changement de la valeur de la CI50.

Nous avons tenté de diminuer la fréquence des résistants dans une parcelle qui a été traitée par un apport de migrants sensibles. Une tendance à la diminution de la résistance aux QoI au cours du temps prévue par le modèle de simulation *Fijiensim* a été observée grâce à des apports dans une parcelle. Cette tendance reste encore à confirmer aussi bien pour la résistance aux QoI qu'aux MBC. Si les tendances se confirment, les apports de 40 feuilles par hectare semblent réalistes pour les producteurs et la technique ne devrait pas représenter un investissement lourd (logistique et main d'œuvre) pour sa mise place.

